



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JUELINA OLIVEIRA DOS SANTOS

ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Anacardium occidentale* L. E *Anacardium microcarpum* Ducke OCORRENTES NO LITORAL DO PIAUÍ, BRASIL

**PARNAÍBA-PI
2017**

JUELINA OLIVEIRA DOS SANTOS

ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke OCORRENTES NO LITORAL DO PIAUÍ, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Biologia Molecular

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ivanilza Moreira de Andrade

Co-orientador: Dr. Simon Joseph Mayo

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

S237e Santos, Juelina Oliveira dos.
Estudo de diversidade genética em populações de *Anacardium occidentale* L. E *Anacardium microcarpum* Ducke ocorrentes no litoral do Piauí, Brasil. – 2017.
79 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2017.
Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Ivanilza Moreira de Andrade.
Co-orientador: Dr. Simon Joseph Mayo
Linha de Pesquisa: Biologia Molecular.

1. Caju. 2. Cajuí. 3. ISSR. 4. Marcadores Moleculares. 5. Populações Nativas. I. Título.

CDD: 581.3

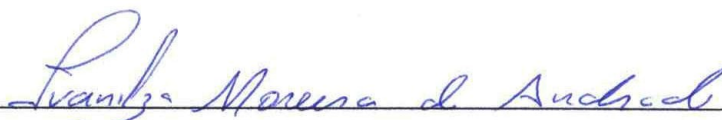
JUELINA OLIVEIRA DOS SANTOS

ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke OCORRENTES NO LITORAL DO PIAUÍ, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 29 / 05 / 2017

BANCA EXAMINADORA



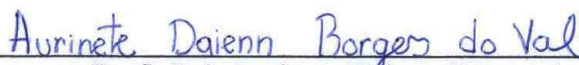
Prof. Dr. Ivanilza Moreira de Andrade

Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso



Prof. Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima

Embrapa Meio-Norte



Prof. Dr. Aurinete Daienn Borges do Val

Universidade Estadual do Piauí - *Campus* Alexandre Alves de Oliveira

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e por saber que ele é o meu porto seguro, a quem confio todos os meus projetos.

Aos meus pais Aloízio Ferreira dos Santos e Maria Júlia de Oliveira dos Santos, por todo o amor, carinho e dedicação. Aos meus amados irmãos: Aline, Juliana, Camila e Carlos Henrique, por sempre acreditarem no meu futuro profissional e por torcerem pela minha felicidade. Ao meu namorado Rafael Bruno por me ajudar sempre quando precisei nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dr^a Ivanilza Moreira de Andrade por toda paciência e dedicação sem você esse trabalho jamais seria realizado, agradeço a Deus por colocar você no meu caminho. Ao Prof. Dr. Simon Mayo, por toda sua paciência ao me ensinar a realizar todas as análises estatísticas, sua contribuição foi essencial.

Aos meus amigos dos Laboratórios Células e Moléculas e Genética e Biologia Molecular por sempre me ajudarem durante as coletas, análises, por me acompanharem nos finais de semanas e feriados. São tantos nomes, mas vamos lá: Jayane, Viviane, Joanna, Jocélia, Loris, Cleiton, Robson, Geise, Tâmisa, Valéria, Hygor, Hianny, Tiago, Ocivana...

Aos os meus amigos da Coordenação de Laboratórios da UFPI, que sempre me ajudaram nos momentos em que precisei me distanciar, em especial a Sansara que segurou muito as pontas na microbiologia, a Laíza que é como minha mãe aqui em PHB, a Mari que se não fosse por ela acho que nem teria passado rrsrs... nunca vou esquecer de nós duas no cursinho preparatório totalmente perdidas rrsrsrs, a Samira que sempre se mostrou disponível para me ajudar e a Hianny que foi minha conselheira durante todo mestrado.

Agradeço também a Artemísia Nazaré e a Liliana, pois elas foram essenciais no início de mestrado sabe aquela luz no fim do túnel...

Aos irmãos amigos do Condomínio Guimarães em especial ao Mayck que me ajudou no inglês e nas correções intermináveis de ABNT... A Keyte que sempre esteve disponível quando precisei, a Roberta por não me deixar faltar nada quando passei horas e horas estudando, vocês fizeram a diferença. Não posso deixar de agradecer a Bruna, Mayara, Francimara, Yasmin, Giovana, Raquel, Germayra vocês são tremendos!!!!

Aos professores do Mestrado em Biotecnologia e a Universidade Federal do Piauí-UFPI. Por fim, a todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

A minha família,
por ser minha base.

Dedico

RESUMO

Anacardium occidentale L., conhecida popularmente como caju, é uma espécie cultivada e naturalizada, amplamente distribuída na zona tropical, tendo o nordeste brasileiro e o domínio do cerrado como centros de diversidade. *Anacardium microcarpum* Ducke, conhecida como cajuí, é característica da vegetação litorânea piauiense e de grande importância socioeconômica e ambiental para população local, diferenciando-se do caju por apresentar hipocarpo e drupa de tamanhos pequenos. Para alguns autores, *A. microcarpum* é sinônimo de *A. occidentale*. Devido à grande amplitude de variação morfológica e estudos de variação genética com amostras de populações naturais destes táxons ainda serem escassos, objetivou-se com o presente estudo caracterizar e comparar a diversidade, estrutura e diferenciação genética das populações naturais de *A. microcarpum* (cajuí) e de associações cultivadas ou naturalizadas de *A. occidentale* (caju) encontradas no norte do Piauí, utilizando marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), além de contribuir ao entendimento taxonômico destes dois táxons. Foram analisadas amostras de oito populações de *A. occidentale* e *A. microcarpum*, com 30 indivíduos cada, dos seguintes locais: Parnaíba (Labino, Pedra do Sal e Rosápolis), Ilha Grande (Cal e Tatus), Cajueiro da Praia, Cocal e Luzilândia. Os cinco *primers* ISSR (UBC 813, UBC 825, UBC 847, UBC 860 e Many) utilizados geraram 94 locos, dos quais todos foram polimórficos, com as porcentagens de polimorfismos variando de 40,43% a 67,02% entre as populações. A variação genética das amostras diferiu tanto dentro como entre as populações de caju e cajuí. Valores médios do Índice de Diversidade de Shannon (I), Heterozigosidade Esperada (H_e) e de Taxa de Polimorfismo (%P) foram maiores nas populações de cajuí 0.24; 0.15; e 57.18% que nas populações de caju 0.19; 0.12; 49.49%. As populações de Pedra do Sal e Tatus (ambas cajuí) foram as mais variáveis nos três índices, enquanto as de Luzilândia e Cajueiro da Praia (ambas caju) foram as menos variáveis. A população de Labino (cajuí) foi a menos variável das quatro populações de cajuí. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) evidenciou que 78% da variabilidade genética encontra-se dentro das populações, com 22% de variância explanada pelas diferenças entre as mesmas. Este nível de diferenciação foi significativo no nível $P \geq 0.001$, como estimado pelo parâmetro PhiPT (PhiPT = 0,217) em teste de permutação com 999 replicações. Os valores de PhiPT para os pares de populações foram testados de forma semelhante com 999 repetições com resultados significativamente diferentes ao nível de $P \geq 0,001$ para todos os pares de populações. O valor de G_{st} 0,149 e o valor de N_m 2,85 indicaram moderada diferenciação genética entre as populações,

confirmando os resultados obtidos na AMOVA, o que sugere existência de cruzamentos entre as populações, corroborado pelo valor de fluxo gênico. O teste Mantel mostrou que não há correlação entre distância geográfica e distância genética (Nei) entre os pares de populações. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) usando a matriz de distância Nei mostrou que as populações de Cocal (caju), Cal (cajuí) e Pedra do Sal (cajuí) foram cada, muito distinta das demais, enquanto as cinco outras populações foram geneticamente mais similares. A análise Bayesiana de estrutura genética mostrou melhor resultado para o modelo de quatro grupos em que as populações de Rosápolis e Pedra do Sal compartilharam o mesmo padrão genético; Cocal teve padrão único; Luzilândia (caju), Cajueiro da Praia (caju) e Labino (cajuí) e parte da população de Rosápolis compartilharam o terceiro padrão; e Tatus (cajuí) e Cal (cajuí) o quarto padrão. Rosápolis se destacou pela estrutura genética bimodal. Os resultados mostraram que as populações naturais de *A. microcarpum* tem maior diversidade genética dentro das populações que as de *A. occidentale* amostradas, embora mostrem forte distinção genética (ex. Cal), não formam uma unidade genética coerente em oposição as populações de caju. Os resultados destacaram a importância das populações naturais de *A. microcarpum* (cajuí) como reservatórios da variabilidade genética do *A. occidentale* (caju, uma árvore frutícola cultivada de importância econômica global) e, portanto, a necessidade urgente de assegurar sua conservação efetiva.

Palavras-chave: Caju. Cajuí. ISSR. Marcadores Moleculares. Populações nativas.

ABSTRACT

Anacardium occidentale L., popularly known as caju, is a cultivated and naturalized species that is widely distributed in the tropical zone, having northeast Brazil and Cerrado biome as its main regions of diversity. *Anacardium microcarpum* Ducke, known as cajuí, is a typical species from coastal vegetation of Piauí State and it is economically and environmentally very important for the local population, differentiating itself from caju by presenting small-sized drupe and hipocarp. For some authors, *A. microcarpum* is synonymous of *A. occidentale*. Considering a wide range of their morphological variation and the fact that few studies of the genetic variation based on samples from natural populations have been made, the objective of this study was to characterize and to compare the genetic diversity, structure and differentiation of natural populations of cajuí and cultivated and naturalized populations of *A. occidentale* (caju) occurring in northern Piauí by using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers, as well as, to contribute to the taxonomic understanding of these two taxa. Eight populations were studied, each with samples of 30 individuals, from the following localities in the Microrregião do Litoral Piauiense: Parnaíba (Labino, Pedra do Sal and Rosápolis), Ilha Grande (Cal and Tatus), Cajueiro da Praia and Cocal, and one locality in the Microrregião do Baixo Parnaíba Piauiense (Luzilândia). Five ISSR primers (UBC 813, UBC 825, UBC 847, UBC 860 and Many) generated 94 loci, which all of them were polymorphic. The polymorphism percentage values ranged from 40,43% to 67,02% between the populations. There was genetic variation of samples between and within populations of caju and cajuí. Mean values of Shannon's Diversity Rate (H'), Expected Heterozygosity (H_e) and polymorphism rate ($\%P$) were higher in the cajuí populations 0.24; 0.15; 57.18% than in the caju populations 0.19; 0.12; 49.49%. Pedra do Sal and Tatus populations (both cajuí) were the most variable populations on all three indices, while Luzilândia and Cajueiro da Praia populations (both caju) were the least variable. Labino population (cajuí) was distinctly less variable than the other three cajuí populations. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that 78% of genetic variance occurred within populations, and 22% of it was expressed between them. This level of differentiation was significant at the $P \geq 0.001$ level, as estimated by the parameter PhiPT (PhiPT = 0.217) and a permutation test of 999 replications. Pairwise population PhiPT values were similarly tested with 999 replications with the result that all population pairs were found to be significantly different at the $P \geq 0.001$ level. The G_{st} value 0.149 and the N_m value 2.85 indicated a moderate genetic differentiation among the

populations confirming the results obtained in the AMOVA, which suggests these populations have been crossing as supported by the generic flow value. Mantel test showed that there was no correlation in geographic and genetic (Nei) distance between population pairs. Principal Coordinate Analysis (PCoA) using a Nei distance matrix showed that populations from Cocal (caju), Cal (cajuí) and Pedra do Sal (cajuí) were very distinct from the rest, while the five other populations were genetically more similar. Bayesian genetic structure analysis gave an optimal result for a four-group model in which the most members of Rosápolis (caju) and Pedra do Sal (cajuí) populations shared one genetic pattern, Cocal (caju) had a unique pattern, Luzilândia (caju), Cajueiro (caju), Labino (cajuí) and part of Rosápolis shared the third pattern and Tatus and Cal shared the fourth one. Rosápolis was notable for its bimodal genetic structure. The results showed natural cajuí populations (*A. microcarpum*) have greater genetic diversity within populations than *A. occidentale* populations, although both populations showed a strong genetic distinction between them, a coherent genetic unit was not formed in opposition to the caju populations. The results highlight the importance of cajuí natural populations as reservoirs of caju genetic variability (a cultivated fruit tree of global economic importance) and the urgent need to ensure their effective conservation.

Keywords: Caju. Cajuí. ISSR. Molecular markers. Natural populations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de distribuição geográfica de <i>Anacardium</i> L.	21
Figura 2.	Cladograma de espécies de <i>Anacardium</i> utilizando dados morfológicos qualitativos e reconstrução filogenética baseada em parcimônia, obtido por Mitchell e Young (1987)	22
Figura 3.	Mapa de distribuição geográfica da espécie <i>Anacardium occidentale</i> L. no Brasil	25
Figura 4.	Produtos obtidos de <i>Anacardium occidentale</i> L. no Brasil	26
Figura 5.	<i>Anacardium occidentale</i> L.: A- Fruto e pseudofruto (pedúnculo), B- planta em seu habitat natural	27
Figura 6.	<i>Anacardium microcarpum</i> Ducke.: Fruto e pseudofruto (pedúnculo), B- planta em seu habitat natural	28

MANUSCRITO

Figura 1.	Área de estudo das populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. (caju) e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke (cajuí)	61
Figura 2.	Gel de agarose com o padrão de amplificação do primer ISSR, UBC 825, nos 30 indivíduos da população de <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke, provenientes de Cal, município de Ilha Grande, Piauí. M- marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb	61
Figura 3.	Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre e dentro das populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke. ocorrentes na microrregião e mesorregião do Piauí	62
Figura 4.	Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.	62
Figura 5.	Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as oito populações do espaço dos eixos 1 (56.94% variância) e 2 (19.26% variância). A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.	63

- Figura 6.** Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as oito populações do espaço dos eixos 1 (56.9% variância) e 3 (11.6% variância). A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal. 64
- Figura 7.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke mostrando a distribuição de todos os indivíduos. Calculado com Genalex 6.502 (Peakall & Smouse 2012). RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal. 65
- Figura 8.** Determinação do número ótimo de K (grupos genéticos) em *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke pelo método Bayesiano usando o critério de otimização Delta K. O ponto de inserção entre o maior valor no eixo Y como o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos) 66
- Figura 9.** Estrutura genética das populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke como divisão de quatro grupos genéticos (K=4) obtidos pela análise Bayesiana. 1- Rosápolis, RO; 2- Cocal, CL; 3- Luzilândia, LU; 4- Cajueiro da Praia, CP; 5- Labino, LA; 6- Pedra do Sal, PS; 7- Tatus, TU; 8- Cal, CA 66

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1.	Dados das populações amostradas de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke	67
Tabela 2.	Oligonucleotídeos de marcador molecular ISSR testados e suas respectivas sequências 5' – 3' Bases: A - Adenina, T - Timina, C - Citosina, G - Guanina, Y - C ou T, R - A ou G	67
Tabela 3.	Relação de iniciadores selecionados para geração de polimorfismos de ISSR. ^a Sequências dos marcadores ISSR, ^b Temperatura de anelamento, ^c Número Total de Locos, ^d Número Locos Polimórficos, ^e Porcentagem de polimorfismo por <i>primer</i> . R= A/G.	68
Tabela 4.	Estimativas de diversidade genética das oito populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke.; N: número de locos polimórficos; %P: porcentagem de locos polimórficos; <i>I</i> : Índice de diversidade Shannon; <i>He</i> : Heterozigosidade Esperada. Dados representam os valores médios ± erro padrão (desvio padrão da média)	68
Tabela 5.	Análise de variância molecular (AMOVA) com todas as populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke tratados como um mesmo grupo	69
Tabela 6.	Valores do índice de fixação PhiPT, entre pares de populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke. e seu significado estatístico, baseado em teste de permutação com 999 replicações. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.	69
Tabela 7.	Estimativas de identidade (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) entre as populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.	70
Tabela 8.	Autovalores (Eigenvalues) da Análise de Coordenadas Principais, usando a distância de Nei (1978)	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Base nitrogenada Adenina
C	Base nitrogenada Citosina
G	Base nitrogenada Guanina
T	Base Nitrogenada Timina
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
SSR	Simple Sequence Repeat – repetições de sequências simples
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat – repetições entre sequências simples
RNA	Ácido ribonucleico
CNSL	Líquido da casca da castanha de caju
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
HCl	Ácido Clorídrico
NaCl	Cloreto de sódio
LCC	Líquido da Castanha de Caju
RPM	Rotações por minuto
AMOVA	Análise da variância molecular
p	Probabilidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ta	Temperatura de anelamento
Taq	<i>Thermis aquaticus</i>
TE	Tampão Tris EDTA
UBC	University of British Columbia – Universidade da Columbia Britânica

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Grama
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanograma
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1	APRESENTAÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Família Anacardiaceae R. Br	19
2.2	Gênero <i>Anacardium</i> L.	20
2.2.1	<i>Anacardium occidentale</i> L.	25
2.2.2	<i>Anacardium microcarpum</i> Ducke.	27
2.3	Marcadores Moleculares	29
2.3.1	Marcadores Moleculares ISSR	31
2.4	Diversidade Genética e Conservação de Populações Naturais	33
3.	REFERÊNCIAS	34
4.	Manuscrito: Estudo de diversidade genética em populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke ocorrentes no litoral do Piauí, Brasil	41
	Estudo de diversidade genética em populações de <i>Anacardium occidentale</i> L. e <i>Anacardium microcarpum</i> Ducke ocorrentes no litoral do Piauí, Brasil	42
	Resumo	43
	Introdução	44
	Materiais e Métodos	46
	Material Vegetal	46
	Extração do DNA	46
	Reação em cadeia de polimerase (PCR) e Seleção de primers ISSR	47
	Análise dos dados	48
	Resultados	49
	Análises de diversidade genética	49

<i>Análises de diferenciação genética e relação entre populações</i>	50
Discussão	52
Agradecimentos	56
Referências	56
ANEXO I	71

1 APRESENTAÇÃO

A família Anacardiaceae está representada por aproximadamente 82 gêneros e 800 espécies com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, podendo também ser encontrada em regiões temperadas (PELL, 2009a). *Anacardium* L. tem destaque entre os demais gêneros devido a sua importância econômica, pois todas suas espécies podem ser utilizadas de diversas formas como fonte de alimento, além de estudos sobre a composição química e atividade biológica de seus extratos e metabólitos terem resultados promissores (GARCIA, 2009).

Anacardium L. é formado por cerca de 10 espécies e dentre elas, *Anacardium occidentale* L., conhecida popularmente como caju, é a espécie mais cultivada e amplamente distribuída, tendo o nordeste brasileiro como o centro de diversidade. Devido a sua variabilidade morfológica, dois ecótipos são reconhecidos: um típico de zonas de restinga, do qual originaram as formas cultivadas, e um típico dos cerrados do Brasil Central, não cultivado e associado à vegetação aberta de fisionomia savanoide desta região (MITCHELL; MORI, 1987).

Anacardium occidentale é encontrada na região tropical, principalmente nas zonas costeiras. É uma árvore nativa do Nordeste do Brasil, a mais dispersa do gênero e a única cultivada (JOHNSON, 1973; MITCHELL; MORI, 1987). Sua distribuição natural não é bem definida devido à dispersão por cultivo, considerando que o principal centro de diversidade do gênero é a região amazônica e o centro secundário os cerrados. Pode ser encontrada em diversos ecossistemas do Norte e Nordeste do Brasil, concentrando-se principalmente nas zonas costeiras do Nordeste, como parte da vegetação de praias e dunas e nas formações de restinga (LIMA, 1986; MITCHELL; MORI, 1987; BARROS, 1991).

Além do caju, tem também sido designado para *A. occidentale* plantas conhecidas popularmente como cajuí, termo usado para descrever as espécies que apresentam castanhas e pedúnculo pequenos, tais como: *Anacardium amilcarianum* Machado. *Anacardium giganteum* W. Hancock ex Engl, *Anacardium humile* A. St- Hil.; *Anacardium microcarpum* Ducke, *Anacardium nanum* A. St-Hil e *Anacardium pumilum* A. St-Hil. Ex Engl. (LIMA, 1988).

O cajuí ocorrente no Piauí tem sido designado por alguns autores como *Anacardium microcarpum*, uma planta da Amazônia Oriental descrita por Ducke (1922). Trata-se de um grupo distinto de *A. occidentale*, diferindo pela textura mais coriácea de suas folhas, pecíolo mais achatado, nervura central fortemente proeminente, inflorescência menos densa, fruto

pequeno e hipocampo mais ácido. No trabalho de Mitchell e Mori (1987) *A. microcarpum* foi tratado como sinônimo de *A. occidentale*. Porém, estes autores não realizaram estudo sobre a classificação infraespecífica da espécie. Silva-Luz e Pirani (2017) em lista de espécies da flora do Brasil, também classificaram *A. microcarpum* como heterótipo de *A. occidentale*. Portanto, até o presente, não há consenso sobre a classificação taxonômica e a distinção entre estas duas espécies. *A. occidentale* tem grande amplitude de variação morfológica principalmente na cor, forma, tamanho e consistência do pedúnculo. Estudos sobre a variação genética baseados em amostras de populações de campo ainda são escassos. Diante deste pressuposto, estudos de caracterização genética em populações naturais de cajuí da restinga do Piauí são importantes.

Dentre as abordagens genéticas, a determinação da variabilidade genética diretamente do DNA, permitida pelo uso de marcadores moleculares tem possibilitado muitos avanços na pesquisa científica, especialmente em estudos de diversidade genética. Entre os marcadores moleculares baseados em PCR, destaca-se o ISSR. Este apresenta elevada porcentagem de polimorfismo, baixo custo e eficiente diferenciação entre indivíduos (GUPTA et al., 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Pesquisas desenvolvidas com plantas usando esta classe de marcadores mostram seu potencial para estudo de diversidade genética (DASMOHAPATRA et.al, 2014; BORGES, 2015), delimitação de espécies (WOOD; NAKAZATO, 2009; RODRIGUES et al., 2014), bem como para o uso em genética da conservação (BRANDÃO, 2008; WANG et al., 2008; SOUZA et al., 2013).

Diante do exposto objetivou-se com este estudo caracterizar e comparar a diversidade, estrutura e diferenciação genética de populações de *A. occidentale* e *A. microcarpum* ocorrentes predominantemente na microrregião do litoral piauiense por meio de marcadores moleculares ISSR.

O presente trabalho foi estruturado em parte pré-textual; textual (Apresentação, Referencial Teórico e Referências, seguindo as normas da ABNT vigente); e um manuscrito com os dados da pesquisa que seguiu as normas do periódico Acta Botânica Brasílica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Anacardiaceae R. Br.

Anacardiaceae R. Br. pertence a ordem Sapindales, clado Malvídeas (Rosídeas) e Eudocotiledôneas (APG IV, 2016). Com base em análises morfológicas, anatômicas e moleculares, são reconhecidas cinco tribos para a Família: Anacardieae, à qual pertence o gênero do caju (*Anacardium* L.); Spondioideae, o gênero do cajá (*Spondias* L.); Semecarpeae, à qual pertence espécie indiana *Semecarpus anacardium* Linn.; Rhoeeae, o gênero *Rhus* L. e Dobineae (PELL, 2004; CORREIA, 2006).

Nas Américas existem aproximadamente 32 gêneros nativos dos quais 77% das espécies são endêmicas do continente americano (TERRAZAS, 1999). Sua distribuição natural pelo mundo se dá desde Honduras, na América Central, até o Sul do Paraná, Brasil e leste do Paraguai. No Brasil, estão registrados 14 gêneros e 55 espécies, dos quais um gênero tem 16 espécies endêmicas e distribuídas em diferentes tipos de vegetação (MITCHELL; MORI, 1987; SILVA-LUZ; PIRANI, 2017).

Os representantes dessa família são caracterizados por serem árvores, arbustos e raramente subarbustos ou lianas; possuem canais de resina na casca e pecíolos. Folhas compostas simples ou pinadas, alternas, raramente opostas, sésseis e pecioladas; opostas, subopostas ou alternadas, inteiras, serrilhadas, denteadas ou crenadas. Inflorescências terminais e/ou axilares, tirsoideas, paniculadas ou racemosas, sendo raras flores solitárias; flores actinomorfas, unissexuais ou bissexuais, dioicas, monoicas, andromonoicas, polígamas ou hermafroditas; ovário súpero, raramente inferior, solitário ou com dois a cinco carpelos conados, óvulo único. Frutos drupas ou sâmaras carnudas ou secas, nunca deiscentes, hipocarpo carnudo e mesocarpo, por vezes, com proeminentes canais de resina preta; uma a cinco sementes, endosperma escasso ou ausente (PELL, 2009b).

Economicamente, são utilizados das plantas os frutos, sementes, madeira e compostos medicinais. Os gêneros mais conhecidos são: *Anacardium* (caju), *Mangifera* (manga), *Pistacia* (pistache) e o *Spondias* (siriguela, cajá e umbu) (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995).

O cajueiro (*A. occidentale*) produz como fruto a castanha-de-caju, enquanto o pedicelo floral espessado (hipocarpo) é comercializado *in natura* ou pode ser utilizado na fabricação de doces, sucos, geleias, cajuína etc. São utilizados também na ornamentação de ruas e praças destacando-se *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Schinus molle* L. e *Rhus succedanea* L., e como

madeira de qualidade apreciável, o guarita (*Astronium graveolens* Jacq.), a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), a aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell) Engl.) e gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng.) (SOUZA; LORENZI, 2005).

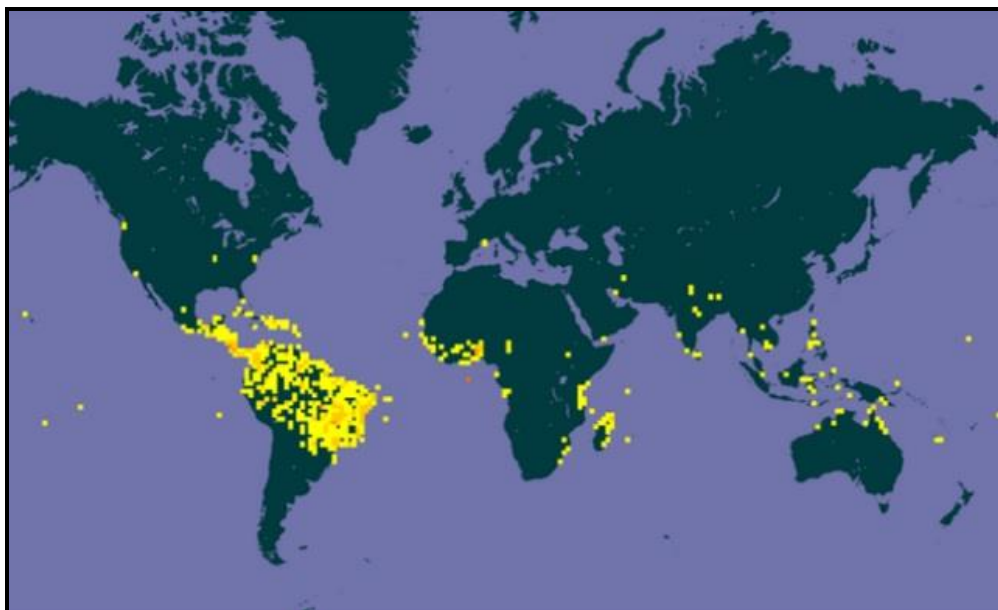
Como fontes medicinais podem ser citadas espécies utilizadas como antifúngicas (FENNER et al., 2006; ARISTIMUÑO FICOSECO et al., 2014; SILVA, et al., 2017) e antibacterianas (AJILEYE et al., 2015;). As espécies do gênero *Rhus* tais como, *R. radicans*, *R. diversibolum*, *R. vernix* e *R. verniciflua* são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa que está associada a presença de constituintes como resina, compostos fenólicos, catecólicos e lipídios (MITCHELL, 1990; CORREIA, 2006).

2.2 *Anacardium* L.

Anacardium é uma palavra do latim *ana*, (voltado) para cima, e *cardium*, coração. *Anacardium* foi descrita por Lineu em 1735, designada por Lindley em 1830 como gênero tipo da família Anacardiaceae e em 1853 *A. occidentale* L. foi citada como tipo do gênero (MITCHELL; MORI 1987). A descrição e ilustração mais antiga do gênero foram publicadas em 1558 pelo naturalista francês André Thevet, após sua estadia na costa do Nordeste e Norte do Brasil (THEVET, 1558). A partir deste trabalho outras descrições e ilustrações da mesma espécie foram realizadas por exploradores portugueses, cronistas e naturalistas europeus pré-Lineanos.

Anacardium tem distribuição natural das Honduras, na América Central, até o Sul do Paraná e leste do Paraguai. *A. excelsum* (Bertero & Balbis ex Kunth) Skeels é a única que ocorre a oeste da cordilheira andina na América do Sul. O Brasil é o mais importante centro de diversidade e se divide em dois eixos: Amazônia Central, centro de diversidade primário, contendo cinco espécies (*A. fruticosum* Mitchell & Mori, *A. giganteum* W. Hancock ex Engl., *A. spruceanum* Benth. ex. Engl., *A. parvifolium* Ducke e *A. microsepalum* Loes.) e o Planalto do Brasil, centro de diversidade secundário, contendo três espécies (*A. humile* A.St.-Hil., *A. nanum* A.St.-Hil. e *A. corymbosum* Barb. Rodr (Figura 1) (MITCHELL; MORI 1987).

Figura 1. Mapa de distribuição geográfica de *Anacardium* L.



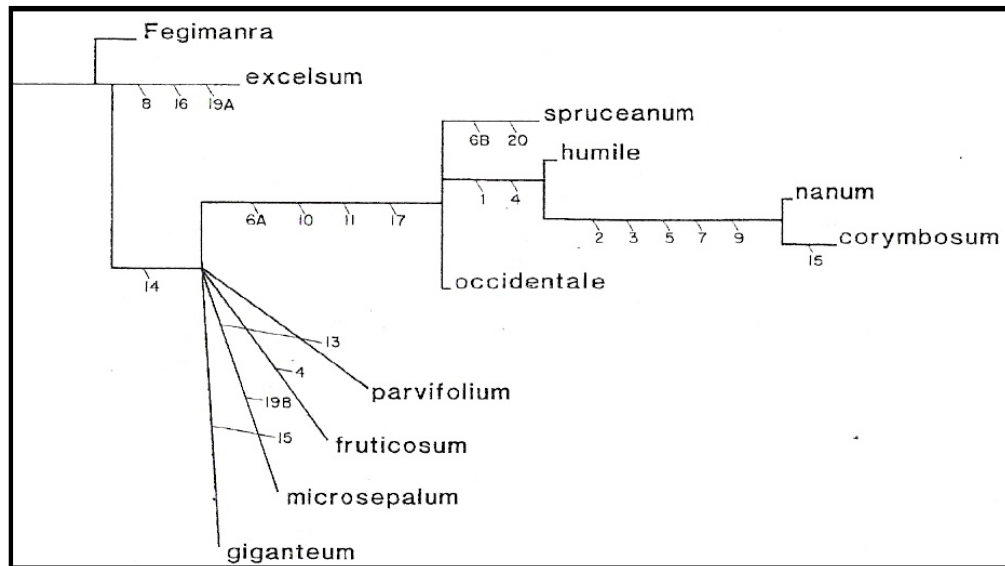
Fonte: GBIF (2017)

Na taxonomia clássica *Anacardium* foi reconhecida como constituído por 20 espécies (JOHNSON, 1973), no entanto, na taxonomia numérica esse número foi reduzido para 10 espécies: *A. occidentale* L.; *A. excelsum* (Bertero & Balb. ex Kunth) Skeels; *A. spruceanum* Benth. ex Engl.; *A. humile* A. St- Hil.; *A. nanum* A. St-Hil.; *A. corymbosum* Barb. Rodr; *A. parvifolium* Ducke; *A. fruticosum* Mitchell e Mori; *A. microsepalum* Loes. e *A. giganteum* W. Hancock ex Engl. (MITCHELL; MORI 1987). Existem controvérsias em relação a esses valores, Lima et al. (1988) defende que tenha cerca de 19 espécies e Cunha (2002) 15 espécies. De acordo com Silva-Luz e Pirani (2017), no Brasil ocorrem nove espécies (*Anacardium amapaense* J.D. Mitch.; *A. corymbosum* Barb.Rodr.; *A. giganteum* W. Hancock ex Engl.; *A. humile* A.St.-Hil.; *A. microsepalum* Loes.; *A. nanum* A.St.-Hil.; *A. occidentale* L.; *A. parvifolium* Ducke; *A. spruceanum* Benth. ex Engl) sendo três delas (*A. corymbosum* Barb. Rodr; *A. microsepalum* Loes. e *A. nanum* A. St- Hil) endêmicas do país. A identificação das espécies é difícil, tanto pela morfologia que apresenta como pela a possibilidade de ocorrer intercruzamento em algumas de suas espécies.

A última revisão taxonômica de *Anacardium* foi realizada por Mitchell e Mori (1987). Estes autores abordaram nesta revisão anatomia, morfologia, ecologia, fitogeografia, relações interespecíficas e botânica econômica. A Filogenia estabelecida por estes dois autores foi estabelecida por Mitchell e Young (1987) utilizando caracteres morfológicos qualitativos e

reconstrução filogenética baseada em parcimônia. Os resultados obtidos foram três clados: a) *A. excelsum*; b) constituído por *A. occidentale*, *A. spruceanum*, *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*; e c) *A. parvifolium*, *A. fruticosum*, *A. giganteum* e *A. microsepalum* (Figura 2).

Figura 2. Cladograma de espécies de *Anacardium* utilizando dados morfológicos qualitativos e reconstrução filogenética baseada em parcimônia, obtido por Mitchell e Young (1987).



Fonte: Mitchell e Young (1987)

As características que definem *Anacardium* são: árvores, arbustos ou subarbustos, perenifólios; ramos inermes, eretos ou semipendentes; sistema caulinar subterrâneo bem desenvolvido nas espécies campestres. Folhas simples, agregadas em direção ao ápice, cartáceas ou coriáceas, pecioladas, margem inteira, ondulada, base assimétrica, venação broquidródoma ou cladódroma, face adaxial com nervuras planas ou impressas, às vezes proeminentes, face abaxial com nervuras geralmente proeminentes, nervura marginal inconspícua, nervura intramarginal ausente. Inflorescência axilar ou terminal, tirsoide corimbiforme, laxa ou congesta, pedunculada; brácteas e bractéolas persistentes ou decíduas. Flores pediceladas, pedicelo não articulado, pentâmeras, bissexuais ou masculinas (plantas andromonoicas); sépalas conatas apenas na base; pétalas alvas ou verde-claras com linhas vermelhas ou rosa na antese e vermelho-escuro após a fertilização, imbricadas, reflexas na antese, tubo campanulado ou cilíndrico; estames desiguais, filetes unidos na base, anteras presentes ou ausentes, tubo estaminal com altura desigual; ovário unicarpelar, unilocular; óvulo basal; estilete longo, central ou lateral; estigma geralmente puntiforme; pistilódio

nas flores masculinas; disco intraestaminal ausente. Fruto drupa reniforme, lateralmente compressa ou obovoide no ápice de um hipocarpo carnoso (o pedicelo espessado); pericarpo coriáceo, resinífero; semente reniforme, testa livre do endocarpo, embrião curvo (LUZ; PIRANI, 2017).

Quanto ao hábito de crescimento são descritas duas formas básicas para *Anacardium*, as espécies de florestas com árvores de dossel ou emergentes (*A. excelsum*, *A. giganteum*, *A. microsepalum*, *A. parvifolium*, *A. spruceanum*) e as espécies de porte médio a baixo com grande envergadura da copa, adaptadas aos ambientes de savana como os cerrados e as áreas de restingas do nordeste brasileiro (*A. occidentale* e *A. fruticosum*). Existem ainda, as espécies *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*, que são subarbustos com troncos subterrâneos e que ocorrem no cerrado do planalto central do Brasil (MITCHELL; MORI, 1987).

A morfologia floral mostra que as flores são reunidas em inflorescências do tipo panícula com flores estaminadas e hermafroditas que podem ser laterais ou terminais. O ciclo de florescimento das espécies de *Anacardium* ocorre no início da estação seca. É restrito a este período para as espécies de ambientes abertos ou savana, onde a estação é mais pronunciada (MITCHELL; MORI, 1987). Segundo Mitchell e Mori (1987), as três espécies simpátricas que ocorrem no planalto central brasileiro (*A. occidentale*, *A. humile* e *A. nanum*) florescem no mesmo período e que parece existir poucas barreiras extrínsecas entre elas, o que explicaria a existência de indivíduos nas populações naturais que são intermediárias entre *A. occidentale* e *A. humile* e entre *A. humile* e *A. nanum*. Além do período de floração, outros fatores ambientais tais como, direção e intensidade do vento, temperatura, número e tipo de polinizadores, entre outros, influenciam nos cruzamentos naturais (ALLARD, 1971).

Os agentes polinizadores podem ser: abelhas, morcegos, borboletas (MITCHELL; MORI, 1987), além de vespas e moscas, sendo as abelhas as melhores polinizadoras (BHATTACHARYA, 2004). Duas espécies de abelhas, uma indígena (*Centris tarsata*) e outra exótica (*Apis mellifera*) foram identificadas como polinizadores potenciais de *A. occidentale* em estudo realizado no litoral do Ceará (FREITAS; PAXTON, 1998). Antes deste estudo, Paulino (1992) tinha observado *Apis mellifera* como sendo a mais importante polinizadora desta espécie.

O estudo realizado por Freitas e Paxton (1998) evidenciou que as panículas em *A. occidentale* apresentam uma proporção de 10% de flores hermafroditas para 90% de flores masculinas, e que as flores masculinas contribuem, proporcionalmente, com a maior quantidade de pólen solúvel. Foi observado também um acúmulo maior de quantidade de

proteína em gemas florais, presumivelmente de flores hermafroditas, indicando que este acúmulo de proteína teria importância na indução do desenvolvimento do gineceu. Como os pistilos são órgãos de diferenciação tardia nas gemas primordiais tardias é possível que a insuficiência de metabólitos seja a causa da baixa produção de flores hermafroditas e maior produção de flores estaminadas (PAVITHRAN et al., 1985).

Embora as espécies sejam alógamas, segundo Barros e Crisóstomo (1995) não há sistema de incompatibilidade que impeça a autogamia, embora a espécie sofra depressão por endogamia, apresentando maior percentual de abortamento de frutos imaturos resultantes da autofecundação (PAULINO, 1992; HOLANDA NETO et al., 2002), redução no percentual de germinação e sementes, bem como no tamanho dos frutos (PAULINO, 1992).

O desenvolvimento do fruto de *Anacardium* é acompanhado pelo tamanho do pedicelo, formando o pedúnculo suculento denominado de hipocarpo. Esse processo é chamado de “frutificação dupla de *Anacardium*”. A drupa amadurece antes do pedicelo. Este é caracterizado por ter crescimento inicial em comprimento e depois aumento de diâmetro na medida que se torna mais suculento. Possui sabor adstringente pela conversão de taninos livres em formas insolúveis no início do processo de desenvolvimento, perdendo gradualmente com a maturação. O acúmulo de antocianinas nas camadas subepidérmicas propicia a cor vermelha brilhante nos pedúnculos de várias espécies (MITCHELL; MORI, 1987). A dispersão dos frutos é feita por morcegos frutíferos (MITCHELL; MORI, 1987) além de ser dispersa pelos rios, pois a castanha e pedicelo juntos podem flutuar na água (JOHNSON, 1974). Segundo os mesmos autores, a dispersão e distribuição de *A. occidentale* devem-se em grande parte a ação antrópica desde o período pré-colombiano.

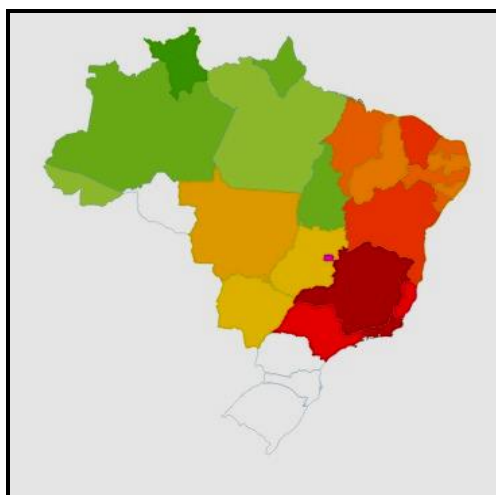
Estudos citogenéticos ainda são pouco realizados em espécies de *Anacardium*, sendo necessários devido a sua grande diversidade morfológica e distribuição (BARROS et al., 2002). Os números cromossomos registrados para *A. occidentale* são: $2n=24$, $2n=30$, $2n=40$ e $2n=42$ (GOLDBLATT, 1981). Aliyu e Awopetu (2007) encontraram $2n=42$ em células mitóticas e $n=21$ em células meióticas em *A. occidentale* encontrado na Nigéria. Para *A. othonianum*, Leão et al. (2001) registraram $2n=16$, em estudos com pontas de raízes de plântulas. Estudo citogenético realizado recentemente com populações de *A. occidentale* e *A. microcarpum* do litoral piauiense evidenciaram que as espécies analisadas apresentaram variação cromossômica, sendo que *A. occidentale* variou desde $2n=20$ a $2n=28$ e *A. microcarpum* $2n=26$ para algumas populações e variação de $2n=20$ e 22 para a população encontrada em Tatus (Ilha Grande-PI) (SANTOS, 2016).

Economicamente, *Anacardium* é importante, pois todas as suas espécies podem ser aproveitadas para diversos fins. A madeira é utilizada na construção civil, a inflorescência tem potencial ornamental (MITCHELL; MORI, 1987). Folhas e cascas são usadas para fins medicinais, o pedúnculo tem grande valor de mercado como alimento e é usado na preparação de sucos, bebidas e doces (SHULTES; RAFFAU, 1990). A amêndoa e o líquido extraído da casca da castanha de caju (CNSL ou LCC) são produtos de exportação (CORREIA, 2006).

2.2.1 *Anacardium occidentale* L.

Anacardium occidentale é uma árvore nativa do Nordeste do Brasil, conhecida popularmente como caju, é a mais cultivada e dispersa do gênero (JOHNSON, 1973; MITCHELL; MORI, 1987). Pode ser encontrada em diversos ecossistemas do Norte e Nordeste do Brasil, concentrando-se principalmente nas zonas costeiras do Nordeste, como parte da vegetação de praias e dunas e nas formações de restinga. Sua distribuição natural não é bem definida devido à dispersão por cultivo, no entanto tem o Nordeste Brasileiro caracterizado como centro de diversidade por apresentar alta variabilidade para os principais caracteres de interesse agroindustrial, tais como, produção, peso do fruto, peso da amêndoa e peso do hipocarpo (LIMA, 1986; MITCHELL; MORI, 1987; BARROS, 1991). A espécie em outros locais de ocorrência onde a planta foi introduzida como Índia, Moçambique, Tanzânia e Quênia, entre outros, tem menos diversidade para estes caracteres (AGNOLINI; GIULIANI, 1977; OHLER, 1979; BARROS et al., 1984; BARROS, 1988a). (Figura 3).

Figura 3. Mapa de distribuição geográfica da espécie *Anacardium occidentale* L. no Brasil.

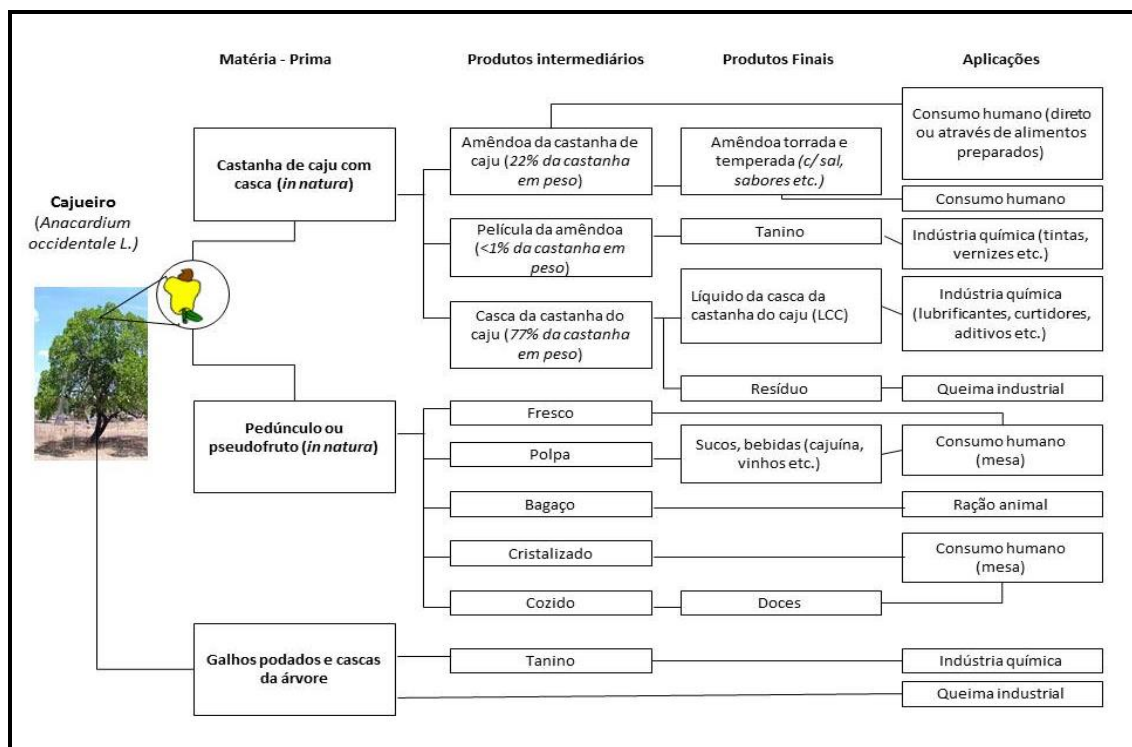


Fonte: Flora Brasil (2017)

No Brasil são encontrados dois tipos de cajueiro bem definidos em relação ao porte que ocorrem naturalmente, denominados de cajueiro do tipo comum e cajueiro do tipo anão precoce (CAVALCANTI et al., 1999). O cajueiro comum é disseminado tanto naturalmente como por cultivo, sendo caracterizado pelo porte mais alto variando de 8 a 15m e envergadura de copa chegando a atingir 20m, enquanto a variedade precoce diferencia-se pelo porte baixo com altura de plantas variando em torno de 3 a 4m e envergadura de copa média em torno de 7 a 9m (BARROS, 1988b).

Da espécie se utiliza todas as partes e se obtém vários produtos, dentre os quais o principal é sua amêndoa (castanha) que é utilizada como alimento. O hipocarpo ou pseudofruto pode ser consumido *in natura* ou ser utilizado na fabricação de doces, polpas para sucos e outras bebidas e o bagaço resultante pode ser misturado na ração animal. Da casca da castanha do caju é extraído o líquido da casca castanha de caju (CNSL ou LCC), com aplicações nobres em indústrias químicas como, por exemplo, na fabricação de tintas, lubrificantes e cosméticos. Ainda da casca, dos galhos podados da árvore, da folha, da película da amêndoa da castanha de caju ou mesmo do bagaço do pedúnculo pode ser extraído o tanino, composto químico com vastas aplicações industriais (USAID, 2006) (Figura 4 e 5).

Figura 4. Produtos obtidos do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no Brasil.



Fonte: USAID (2006)

Figura 5. *Anacardium occidentale* L.: A- Fruto e pseudofruto (pedúnculo), B- planta em seu habitat natural.



Fonte: Autora (2017)

A cajucultura no Brasil está concentrada no Nordeste e atualmente o país ocupa a décima posição na produção mundial. A Nigéria, a Índia e a Costa do Marfim foram os maiores produtores mundiais de castanha em 2014, com quase 60% da produção global. A área ocupada com o cajueiro no Brasil segundo o IBGE em 2015, foi estimada em 619 mil hectares, desse total, 99,4% está localizado no Nordeste, sendo 62,9% no Estado do Ceará (389.358 ha), 15,5 % no Rio Grande do Norte (96.120 ha) e 14,1% (87.474 ha) no Piauí (VIDAL, 2016).

2.2.2 *Anacardium microcarpum* Ducke

Dentre as espécies e ecótipos de *Anacardium*, tem-se o cajuí, termo usado para designar as espécies que apresentam castanhas e hipocarpo diminutos (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003). Trata-se de uma planta nativa, dispersa na região dos cerrados da Amazônia e nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileiro (CRESPO; SOUZA, 2014). No Piauí é encontrado naturalmente na região dos cerrados e na região litorânea (RUFINO et al., 2007).

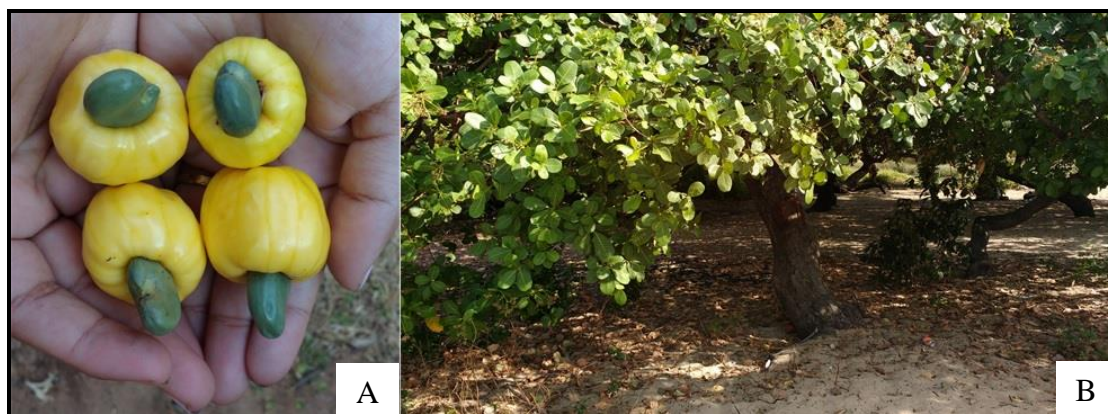
O litoral piauiense ocupa uma área territorial de 66 km abrangendo os municípios de Parnaíba, Ilha Grande, Luís Correia e Cajueiro da Praia (ANDRADE et al., 2012). O cajuí está presente nesta região nas áreas de restinga e carrasco, e na vegetação pioneira de dunas,

onde sua maior ocorrência está nas comunidades Labino, Pedra do Sal, Cal e Tatus, desempenhando grande importância ecológica (CRESPO; SOUZA, 2014).

O cajuí se caracteriza como uma árvore frondosa de 2 a 5 metros de altura e 50-90 cm de diâmetro, de tronco reto e casca espessa, com a copa as vezes atingindo até mais de 15 metros de altura (Figura 6). Suas folhas são pecioladas, densas no ápice dos ramos, 14-20 cm de comprimento, subcoriáceas, ápice arredondado e base cuneada, mais duras que as folhas do caju comum, coloração verde, glabras de forma obovada. Suas flores são pequenas, perfumadas, coloração esbranquiçada, tornando-se róseo-claras e depois vermelhas, corola pentâmera reflexas na antese, estames em oito, conatos na base e de tamanhos variados, tendo só um fértil e bem desenvolvido (BARROS et al., 2002; CRESPO; SOUZA, 2014).

O tamanho e peso da castanha e do hipocarpo são os principais caracteres utilizados para diferenciar caju e cajuí, sendo o último, de modo geral, menor e mais leve. O peso médio da castanha do cajuí em trabalhos realizados com amostras da região litorânea do Piauí foi de 3 g (RUFINO, 2004; BORGES, 2015) e o peso médio do hipocarpo variou de 15 a 20 g e 3 cm de comprimento (RUFINO, 2004; CRESPO; SOUZA, 2014) (Figura 6).

Figura 6. *Anacardium microcarpum* Ducke.: Fruto e pseudofruto (pedúnculo), B- planta em seu habitat natural.



Fonte: Autora (2017)

De acordo com a taxonomia clássica, o cajuí ocorrente nos estados do Ceará, Maranhão, Pará e Piauí têm sido identificados como *Anacardium microcarpum* Ducke por alguns autores (LIMA, 1996; VIEIRA; MAYO; ANDRADE, 2014; ZUFFO, 2014; MOREIRA; SILVA; MEDEIROS FILHO; 2016). Entretanto, este táxon é tratado como um dos sinônimos de *A. occidentale* por Mitchell e Mori (1987). *A. microcarpum* foi agrupado, pela taxonomia numérica, como uma das variantes da espécie cultivada, *A. occidentale*.

Cunha (2002) utilizou sequências dos genes rDNA 18S para fazer a reconstrução filogenética do gênero e concluiu que *A. microcarpum* é um ecótipo ou variedade de *A. occidentale*. Silva-Luz e Pirani (2017), também classificaram *A. microcarpum* como um heterótipo de *A. occidentale*.

Estudo morfométrico de folhas de *A. occidentale* e *A. microcarpum* mostrou sobreposição em relação aos caracteres estudados, e embora os caracteres possam ser utilizados para uma identificação prévia, faz-se necessário estudos ao nível molecular para uma confirmação, pois apenas caracteres morfológicos são susceptíveis a variação ambiental (VIEIRA; MAYO; ANDRADE, 2014). No entanto, uma caracterização genética de acessos de germoplasma de cajuí (*Anacardium* spp.) ocorrentes no litoral piauiense, por meio de marcadores moleculares ISSR, mostrou distância genética de *A. microcarpum* com os demais acessos analisados de *Anacardium* spp. constituindo um subgrupo diferenciado (BORGES, 2015).

O cajuí desempenha um importante papel econômico e ambiental nos municípios do litoral piauiense, principalmente para as populações que vivem nas regiões onde há maior abundância desta frutífera. Assim como o caju comum, a temporada de floração e frutificação do cajuzeiro ocorre entre os meses de junho a dezembro, sendo o período de maturação dos frutos mais concentrado nos meses entre agosto e novembro. A comercialização de castanhas e hipocarpos na época da safra é fonte de renda garantida para as populações locais. Do ponto de vista ambiental, a planta é um dos principais fixadoras de dunas. Por ser um importante elemento da vegetação natural e encontrar-se em perigo devido a diversas ações antrópicas, se faz necessário sua proteção e conservação (RUFINO, 2004).

2.3 Marcadores moleculares

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. O pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres significativos. Além disso, a disponibilidade de marcadores morfológicos era restrita as poucas espécies de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As mudanças nesse quadro iniciaram com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, que foram os primeiros marcadores moleculares utilizados para análise de variação genética (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995). As isoenzimas são enzimas

que apresentam múltiplas formas moleculares, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (MOSS, 1992). A técnica é baseada na detecção de polimorfismos a partir da eletroforese em gel de amido e na visualização por métodos histoquímicos.

Os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, no caso de isoenzimas ou de um segmento específico de DNA correspondente às regiões expressas ou não do genoma e que são transmitidos pelas leis padrão de herança de uma geração para a outra, dessa forma são extremamente úteis para analisar a variabilidade genética. Os marcadores moleculares são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, mapeamento genético, filogenia molecular, melhoramento genético dentre outras finalidades (CAIXETA et al., 2006).

Com os avanços na área da genética e da biologia molecular e o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, tornou-se possível a manipulação do DNA, culminando com a criação dos marcadores moleculares provenientes da análise da molécula de DNA, permitindo o acesso direto ao genótipo do indivíduo e não somente das regiões ativas na expressão gênica como ocorrer com as isoenzimas. Esses marcadores moleculares têm como vantagens a obtenção de um número elevado de polimorfismo genético em qualquer estágio do desenvolvimento da planta e os resultados não sofrem influência do ambiente como ocorre com os marcadores morfológicos (AYAD et al., 1995; FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares podem ser divididos em dois grupos: marcadores baseados em hibridização (RFLP e minissatélites) e marcadores baseados em PCR que inclui RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*); Microsatélites - SSR (*Simple Sequence Repeats*); ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e os marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Além disso, podem ser agrupados em marcadores dominantes e codominantes. Os marcadores dominantes (ex.: ISSR, RAPD, AFLP) permitem obter dados de diversos locos do genoma, enquanto que os codominantes (ex.: RFLP, Microsatélites-SSR) revelam alelos de um loco específico do genoma. Marcadores codominantes, por sua vez, tais como microsatélites (SSR), permitem distinguir indivíduos heterozigotos de homozigotos e calcular frequência de alelos e, por essa razão, marcadores codominantes são considerados mais informativos que os marcadores dominantes (FREELAND, 2005). Portanto, marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética na quantificação da

variabilidade genética existente entre e dentro de populações de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O uso de um ou de outro marcador vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura, dos recursos financeiros disponíveis, da disponibilidade dos recursos humanos e da espécie a ser estudada. Vários marcadores moleculares estão disponíveis e podem ser aplicáveis em diversas situações, por isso, torna-se necessário a realização de uma escolha cuidadosa do marcador, levando-se em conta as questões biológicas que são de interesse para cada estudo (FALEIRO, 2007).

2.3.1 Marcadores Moleculares ISSR

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) foram desenvolvidos a partir de marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*). Estes são sequências de nucleotídeos repetidas em *tandem*, cuja unidade de repetição varia de um a seis pares de base. São encontrados abundantemente em uma ampla diversidade de espécies de eucariotos e procariotos e mesmo no genoma cloroplastidial de plantas, os locos SSR apresentam alto índice de polimorfismo e o uso desse marcador requer o conhecimento prévio das sequências que flanqueiam a região do microssatélite (HEARNE; GHOSH; TODD, 1992; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os ISSR foram desenvolvidos por Gupta et al. (1994) e Zietkiewicz, Rafalski e Labuda (1994) e se tornaram bastante utilizados desde então. O desenvolvimento desses marcadores teve como intuito solucionar a problemática da necessidade do conhecimento prévio das sequências que flanqueiam os microssatélites para formação dos *primers*. Os marcadores ISSRs são aleatórios e tem a capacidade de acessar todo o genoma, e são ferramentas importantes para identificar polimorfismo e quantificar a variabilidade genética entre indivíduos de interesse (LIU; WENDEL, 2001). Outra importante característica deste tipo de marcador é que são dominantes, ou seja, não possibilitam a diferenciação de indivíduos heterozigotos e homozigotos, no entanto, tem a vantagem de analisar vários alelos em uma única reação. São mais robustos que os RAPDs, pois apresentam uma maior superfície de ancoragem e possuem maiores temperaturas de anelamento, aumentando a reprodutibilidade dos produtos (TSUMURA; OHBA; STRAUS, 1996).

A técnica utilizada para o marcador ISSR é baseada em PCR, e envolve a amplificação de sequências de DNA presentes numa região de distância amplificável entre

duas regiões repetidas idênticas de microssatélites orientadas em direção opostas. Sequências de microssatélites com comprimento de 16-25pb são utilizadas como *primers* em reação de PCR para amplificar sequências inter-SSR com tamanhos variados de 200-2000pb que são detectados tanto por eletroforese em gel de agarose como em gel de poliacrilamida, para a obtenção dos perfis de ISSR é utilizado um único *primer* (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

A fonte de variabilidade nos ISSRs pode ser atribuída ao deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA e falha em reparar erros no pareamento das bases nitrogenadas, isso é considerado como um mecanismo de criação e hipervariabilidade nos SSRs (LEVINSON; GUTMAN, 2001). Os alelos polimórficos ocorrem quando em um genoma esteja faltando à sequência repetida ou têm uma deleção ou uma inserção que modifica a distância entre as repetições (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001). O grau de polimorfismo pode variar também de acordo com a natureza do *primer* (que pode ser não ancorado, 3'-ancorado, ou 5'-ancorado) e com a sequência das repetições no *primer* empregado. Uma vez que o *primer* é uma sequência SSR, a frequência e a distribuição dos microssatélites repetidos em diferentes espécies também influenciam o padrão de bandas (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Os marcadores ISSR oferecem algumas desvantagens, pois apresentam menor nível de polimorfismo se comparados com marcadores SSR (WOLFE; LISTON, 1998) e que marcadores AFLP (ARCHAK et al., 2003). Além disso, marcadores moleculares dominantes, tais como AFLP, ISSR e RAPD apresentam fragmentos de DNA co-migrantes que podem representar locos distintos, mas serem interpretados como homólogos devido ao tamanho idêntico (BUSSELL; WAYCOTT; CHAPPILL, 2005).

Apesar das limitações apresentadas, os marcadores ISSR são recomendados para análises de espécies relacionadas evolutivamente, obtendo-se resultados confiáveis, devido a sua abundância e dispersão no genoma, sendo marcadores de alta reprodutibilidade, locos polimórficos em quantidades satisfatórias e por apresentarem rapidez em seus resultados com custos razoavelmente menores em comparação aos outros marcadores (RODRIGUES et al., 2014). Além de estudos de avaliação da diversidade genética (BORGES, 2015; GONÇALVES, 2016; GOMES, 2017), podem ser utilizados em estudos taxonômicos para delimitação de espécies complexas (RODRIGUES et al., 2014), estudos populacionais (TABIN et al., 2016), caracterização de cultivares (EISSA et al., 2016) e espécies de plantas de importância econômica, tais como em *Fragaria ananassa* Duch (NUNES et al., 2013),

Genipa americana L. (SILVA et al., 2014), *Psidium* spp. (OLIVEIRA et al., 2014), e *Passiflora cincinnata* Mast. (CARMO et al., 2017), com o propósito de determinar o relacionamento genético entre as espécies e possibilitar uma melhor identificação para conservação de germoplasma e desenvolvimento de novos cultivares.

2.4 Diversidade genética e conservação de populações naturais

A genética da conservação tem como uma de suas premissas que não se pode proteger o que não se conhece. Assim, um dos principais temas abordados em estudos de biologia da conservação é a resolução das incertezas taxonômicas, portanto, é essencial o estabelecimento de *status* taxonômico dos organismos de acordo com a maior diversidade de caracteres possível. Isso porque, o conhecimento taxonômico da maioria das espécies é resumido à variação macromorfológica e informações limitadas relacionadas à distribuição geográfica. Além disso, a delimitação dos táxons baseada na morfologia e biogeografia podem esconder linhagens crípticas, comprometendo esforços para a definição de manejo sustentável e conservação (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004).

Compreender o comportamento e distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações tem grande relevância pela relação direta com o alcance do fluxo gênico, gerando informações importantes na definição de programas para a conservação de populações evolutivamente estáveis bem como para auxiliar no manejo racional e sustentável dessas populações (NEWTON et al., 1999).

Para o estudo de variabilidade genética, o uso de marcadores moleculares é bastante útil e tem bons resultados. No trabalho de Rossi et al. (2014), utilizando marcadores ISSR, os autores observaram que as populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. (Buriti) (Arecaceae) apresentaram alta variabilidade genética intrapopulacional (84,14%) e uma boa estratégia para a conservação efetiva dessa variabilidade seria a preservação de várias populações ao longo da distribuição geográfica da espécie, o que garantiria que a alta diversidade genética encontrada fosse mantida nas diferentes populações.

Portanto, estudos sobre diversidade genética são necessários para que se possam identificar genótipos endêmicos e de importância evolutiva. Além disso, a implantação de projetos multidisciplinares que englobam estudos biológicos, a conscientização ambiental das comunidades e preservação dos habitats naturais é indispensável para conservação das espécies (RODRIGUES et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS

- AGNOLINI, M.; GIULIANI, F. **Cashew cultivation**. Bologna: Instituto Agronomico per L'Oltremare, 168p, 1977.
- AJILEYE, O. O. et al. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University-Science**, v. 27, n. 3, p. 244-252, 2015.
- ALIYU, O. M.; AWOPETU, J. A. Multivariate Analysis of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Germplasm in Nigeria. **Genetica**, v. 56, p. 3–4, 2007.
- ALLARD, R. Sistemas reprodutivos e métodos de melhoramento de plantas. In: ALLARD, R. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgar Blucher, Cap. 4, p 25-35, 1971.
- ANDRADE, I. M. et al. Diversidade de Fanerógamas do Delta do Parnaíba – Litoral Piauiense. In: GUZZI, A. **Biodiversidade do Delta do Parnaíba: litoral piauiense**. Parnaíba: EDUFP, 2012.
- APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 181, p. 1–20, 2016.
- ARCHAK, S. et al. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. **Genome**, v.46, p. 362-369, 2003.
- ARISTIMUÑO FICOSECO, M. E. et al. Antifungal and antimycotoxigenic metabolites in Anacardiaceae species from northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of *Fusarium species*. **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 5, p. 1262-1273, 2014.
- AYAD, W.G. et al. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. In: **Report of an IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) Workshop**, Rome, 137p, 1995.
- BARROS, L. M. Biologia floral, colheita e rendimento. In: LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, p.301-319, 1988a.
- BARROS, L. M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas multivariadas**.1991. 256 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ, Piracicaba, 1991.
- BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoramento Genético do Cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. Fortaleza: EMBRAPA\CNPAT, p.73-96, 1995.

- BARROS, L. M. et al. **A cultura do cajueiro anão**. Fortaleza: EPACE, 67p, 1984.
- BARROS, L. M. Melhoria. In: LIMA, V. P. M. S. **A cultura do Cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil/ETENE, p. 321-355, 1988b.
- BARROS, L. M et al. **Cajueiro**. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, MG:UFV. p. 212-242, 2002.
- BHATTACHARYA, A. Flower visitors and fruit set of *Anacardium occidentale*. In: **Annales Botanici Fennici**. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board, v. 41, p. 385-392, 2004.
- BORGES, A. N. C. **Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium spp.*) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR**. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - UFPI, Teresina. 2015.
- BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor fragmento no sul de Minas Gerais**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BUSSELL, J. D.; WAYCOTT, M.; CHAPPILL, J. A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. **Perspectives in plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 7, n. 1, p. 3-26, 2005.
- CAIXETA, E. T. et al. Tipos de Marcadores moleculares. In: CAIXETA, E. T.; BORÉM, A. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, cap. 1, p. 9-78, 2006.
- CARBAJAL, A. C. R.; SILVA JÚNIOR, N. **Castanha de caju: recomendações práticas para a melhoria da qualidade**. Fortaleza: Sebrae-CE/Embrapa Agroindústria Tropical, 16p, 2003.
- CARMO, T. V. B. et al. Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. Based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 1, p. 68-77, 2017.
- CAVALCANTI, J. J. V. et al. Banco ativo de germoplasma de caju: variabilidade, caracterização e utilização. In: FERREIRA, F. R. **Recursos genéticos de espécies frutíferas no Brasil**, Brasília: Embrapa/CNPAT, 1999.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M; Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae, **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1287-1300, 2006.
- CRESPO, M. F. V.; SOUZA, L. I de. **Cajuí: boas práticas e manejo sustentável**. Parnaíba: Sieart, 27p, 2014.
- CUNHA, R. M. S. da. **Filogenia Molecular em *Anacardium* (Anacardiaceae): utilização do gene da subunidade pequena do RNA ribossômico (SSU rRNA)**. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - UFC, Fortaleza, 2002.

DASMOHAPATRA, R. et al. Molecular and agromorphological assessment of cashew (*Anacardium occidentale* L.) genotypes of India. **Journal of Applied Horticulture**, Minnesota, v. 16, p. 215-221, 2014.

DUCKE, A. **Plantas novas ou pouco conhecidas da região Amazônica**. Archivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 1922.

EISSA, E. A. et al. Morphological and molecular genetic characterization of soft date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Egypt. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, v. 38, n. 2, p. 269-284, 2016.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 102 p, 2007.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 220 p, 1998.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: University Press, 220 p, 2004.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

FREITAS, B.; PAXTON, R. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris trasata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Ecology**, v. 35, p 109-121, 1998.

GBIF Secretariat. **GBIF Backbone Taxonomy**. Disponível em: <<http://doi.org/10.15468/39omei>> Acesso em: 11 mar. 2017.

GARCIA, A. F. Análises filogenéticas do gênero *Anacardium*. 92f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers 1975- 1978. Monographs in Systematic Botany. **Missouri Botanical Garden**, v. 6, p. 553, 1981.

GOMES, M. F. C. Diversidade e estrutura genética em populações de *Anacardium spp.* do **Parque Nacional de Sete Cidades (PI) por meio de marcadores ISSR**. 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - UFPI, Teresina. 2017.

GONÇALVES, T. O. **Diversidade e estrutura genética de populações de batata da serra (*Ipomoea serrana* Sim. Bianch. & L.V. Vasconcelos) da Chapada Diamantina, Bahia, utilizando marcadores ISSR**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, Piracicaba, 2016.

- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 81-89, 2001.
- GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and applied genetics**, v. 89, n. 7-8, p. 998-1006, 1994.
- HEARNE, C. M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics**, v. 8, n. 8, p. 288-294, 1992.
- HOLANDA NETO, J. P. et al. Low seed/nut productivity in cashew (*Anacardium occidentale*): effects of self-incompatibility and honey bee (*Apis mellifera*) behaviour. **Journal of Horticultural Science**, v. 77, p. 226-231. 2002
- JOHNSON, D., **O caju do Nordeste do Brasil: um estudo geográfico**. Fortaleza: ETENE, p.169, 1974.
- JOHNSON, D. V. The botany, origin and spread of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of plantation crops**, Kasaragod, v.1, n.1, p.1-7, 1973.
- LEÃO, A. C. M. et al. Análise Citogenética da Espécie de Caju-do-Campo *Anacardium othonianum*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., Águas de Lindóia-SP, **Anais...**Ribeiro Preto: SBG, 2001 CD-ROM.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 3, p. 205-208, 2001.
- LIMA, P. R. de A. et al. Avaliação agrônômica de fruteiras nativas do Meio-Norte do Brasil. **Embrapa Meio-Norte-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1996.
- LIMA, V. P. M. S. Botânica. In: LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, p.15-61,1988.
- LIMA, V. P. M. S. **Fruteiras: uma opção para o reflorestamento do Nordeste**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1986. 94p.
- LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 3, p. 205-208, 2001.
- LUZ, C. L. S; PIRANI, J. R. *Anacardiaceae* In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4381>>. Acesso em: 06 mar. 2017
- MITCHELL, J.; YOUNG, D. Cladistics analysis. IN: MITCHELL, John; MORI, Schott. The cashew and its relatives (*Anacardium*: Anacardiaceae). **Memoirs of the New York Botanical Garden**, New York. Pp. 24-27, 1987.
- MITCHELL, J. D. The poisonous Anacardiaceae genera of the world. **Advances in economic botany**, v.8, p. 103-129, 1990.

MITCHELL, J. O.; MORI, S. A. The cashew and its relatives (*Anacardium occidentale* L.) **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 42, n. 1, p.1-76, 1987.

MOREIRA, F. J. C.; DA SILVA, M. A. P.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação e crescimento inicial de cajuí (*Anacardium microcarpum* DUCKE) em função do tamanho das sementes e do tempo de embebição. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 15, n. 1, p. 19-28, 2016.

MOSS, D. W. **Isoenzymes**. London: Capman & Hall, 1992.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 4, p. 140-145, 1999.

NUNES, C. F. et al. The genetic diversity of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) hybrids based on ISSR markers. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 4, p. 443-452, 2013.

OHLER, J. G. **Cashew**. Amsterdam. Koninklijk: Instituut voor de Tropen, 260p, 1979.

OLIVEIRA, N. N. S. de et al. Analysis of genetic distance between accessions of the genus *Psidium* by route markers ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 917-923, 2014.

PAULINO, F. D. G. **Polinização entomófila em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no litoral de Pacajus – CE**. 1992. 70f. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

PAVITHRAN, K. et al. Development, differentiation and evolution of sex-dimorphism in cashew. **Acta Horticultura**, n. 108, p. 17-19, 1985.

PELL, S. K. **Anacardiaceae: cashew family**, 2009a. Disponível em: <<http://tolweb.org/Anacardiaceae/21262/2009.01.03>> Acesso em: 20 jun. 2016

PELL, S. K. **Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae)**. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Louisiana State University, Louisiana, 2004.

PELL, S. K. Neotropical Anacardiaceae. In: MILLIKEN, W.; KLITGÅRD, B.; BARACAT, A. **Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics**, 2009b. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Anacardiaceae.htm>>. Acesso em 20 jun. 2016.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

RODRIGUES, J. F. et al. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C. mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 5, p. 1345-1359, 2014

- ROSSI, F. S. et al. Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 104, p.631-639, 2014.
- RUFINO, M. S. M. **Qualidade e potencial de utilização de cajuís (*Anacardium spp*) oriundos da vegetação litorânea do Piauí**. 2004. 92p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2004.
- RUFINO, M. S. M. et al. **Suporte técnico para a exploração racional do cajuzeiro**. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará: Fortaleza, n. 7, p. 30, 2007.
- SANTOS, V. M. A. **Estudo citogenético de morfotipos de *Anacardium occidentale* l. do litoral piauiense, Brasil**. 2016. 59f. Universidade Federal do Piauí, 2016.
- SHULTES, R.; RAFFAU, R. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of Northwest Amazonia. **Environmental Conservation**, v. 17, n. 03, p. 284-285, 1990.
- SILVA, A. V. C. et al. Diversity and genetic structure of jenipapo (*Genipa americana* L.) Brazilian accessions. **Scientia Agricola. Piracicaba**, v. 71, n. 5, p. 387-393, 2014.
- SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J.R. *Anacardiaceae* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4381>>. Acesso em: 06 mar. 2017
- SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática-ilustrado para a identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado no APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2005.
- TABIN, S. et al. Genetic diversity and population structure of Rheum species in Kashmir Himalaya based on ISSR markers. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 223, p. 121-128, 2016.
- TERRAZAS, T. Anatomía de la madera de Anacardiaceae con énfasis en los géneros americanos. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v. 64, p. 103-109, 1999.
- THEVET, A. **Singularidades da França Antártica**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1558. 540p.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas variabilidade genéticas em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186p
- TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUS, S. H. I Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.1, p. 40-45, 1996.
- USAID BRASIL. **Análise da indústria de castanha de caju: inserção de micro e pequenas empresas no mercado internacional**. São Paulo: DAI. v. 1, 2006.
- VIDAL, M. F. Situação da cajucultura nordestina após a seca. **Caderno Setorial ETENE**, n.4, p. 17-25, 2016.

VIEIRA, M.; MAYO, S. J.; ANDRADE, Ivanilza Moreira. Geometric morphometrics of leaves of *Anacardium microcarpum* Ducke and *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) from the coastal region of Piauí, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 315-327, 2014.

WANG, C. et al. Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 9, p. 699-705, 2008.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D. E. et al. **Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing**. New York: Kluwer, p. 43-86, 1998.

WOOD, T. E.; NAKAZATO, T. Investigating species boundaries in the *Giliopsis* group of *Ipomopsis* (Polemoniaceae): Strong discordance among molecular and morphological markers. **American Journal of Botany**. New York, v.96, p.853-861, 2009.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

ZUFFO, A. M. et al. Posição e profundidade de semeadura na emergência e desenvolvimento inicial de mudas de *Anacardium microcarpum* Ducke. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, 2014.

4. Manuscrito: Estudo de diversidade genética em populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke ocorrentes no litoral do Piauí, Brasil

Original article

Estudo de diversidade genética em populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke ocorrentes no litoral do Piauí, Brasil

Juelina Oliveira dos Santos¹, Simon Joseph Mayo² & Ivanilza Moreira de Andrade¹

¹Programa de Pós-Graduação Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade Federal do Piauí, Campus de Parnaíba, Av. São Sebastião 2819, 64202-020 Parnaíba, PI, Brasil.

²Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AE, UK. Royal Botanic Gardensx2 Kew, Herbarium, Monocotyledons. Kew Green, Kew TW93AE - Richmond, Inglaterra.

Corresponding author: juelina@ufpi.edu.br

Resumo

Anacardium occidentale L., conhecida popularmente como caju, é uma espécie cultivada e naturalizada amplamente distribuída na zona tropical. Uma variação desta espécie, reconhecida como *Anacardium microcarpum* Ducke e denominada popularmente como cajuí, característico da vegetação litorânea piauiense de grande importância socioeconômica e ambiental para população local, diferenciando-se do caju por apresentar hipocarpo e drupa de tamanhos pequenos. Até o momento não há estudos suficientes que diferenciem estes dois táxons. Portanto, objetivou-se caracterizar geneticamente as populações naturais de cajuí e de associações cultivadas ou naturalizadas de caju encontradas no norte do Piauí, utilizando marcadores moleculares Inter Simple Repeat (ISSR). Foram utilizadas oito populações com cinco primers ISSR e realizadas análises de diversidade genética, estrutura e diferenciação populacional. Os resultados mostraram o total de 94 locos, todos polimórficos e que as populações naturais de cajuí (*A. microcarpum*) são mais diversas geneticamente dentro das populações que as de *A. occidentale*. Embora ambas as populações mostrem forte distinção genética, não foi formada uma unidade genética coerente. Os resultados destacaram a importância das populações naturais de cajuí como reservatórios da variabilidade genética do caju (uma árvore frutícola de importância econômica global) e, portanto, a necessidade urgente de assegurar sua conservação efetiva.

Palavras-chaves: Caju; Cajuizeiro; ISSR; Populações nativas; Variabilidade genética.

Introdução

Anacardium occidentale L., conhecida popularmente como “caju”, é uma árvore nativa do Nordeste Brasileiro, a mais dispersa do gênero e a única cultivada (Johnson 1973; Mitchell & Mori 1987). Pode ser encontrada em diversos ecossistemas do Norte e Nordeste do Brasil, concentrando-se principalmente nas zonas costeiras do Nordeste, como parte da vegetação de praias, dunas e nas formações de restinga (Lima 1986; Mitchell & Mori 1987; Barros 1991).

O cajueiro tem importante papel socioeconômico e dessa espécie se utiliza todas suas partes obtendo vários produtos, dentre os quais o principal é a amêndoa (castanha), utilizada como alimento. O hipocarpo ou pseudofruto pode ser consumido *in natura* ou ser utilizado para a fabricação de doces, polpas para sucos e outras bebidas; o bagaço resultante do processamento pode ser utilizado na constituição da ração animal; da casca da castanha é extraído um líquido, denominado LCC (líquido da castanha de caju), com aplicações nobres em indústrias químicas como, por exemplo, na fabricação de tintas, lubrificantes e cosméticos. Ainda da casca, dos galhos podados da árvore, da folha, da película da amêndoa da castanha de caju ou mesmo do bagaço do pedúnculo pode ser extraído o tanino, composto químico com vastas aplicações industriais (Usaid 2006).

Uma variação do caju é o conhecido popularmente como cajuí, de fruto e hipocarpo diminutos, o termo cajuí é utilizado para algumas espécies de *Anacardium*, tais como, *Anacardium amilcarianum* Machado, *Anacardium giganteum* W. Hancock ex Engl.; *Anacardium humile* A. St- Hil.; *Anacardium microcarpum* Ducke, *Anacardium nanum* A. St-Hil e *Anacardium pumilum* A. St-Hil. Ex Engl. (Lima 1988; Carbajal & Silva Junior 2003; Pessoni 2007; Almeida 2009).

No Piauí, o cajuí é encontrado naturalmente na região dos cerrados e na região litorânea (Rufino *et al.* 2007), onde desempenham grande importância ecológica, caracterizando-se como componente da vegetação pioneira de dunas (Crespo & Souza 2014), além de possuírem importante papel econômico e ambiental, principalmente para as populações que vivem nas regiões onde há maior abundância desta frutífera. A comercialização de castanhas e hipocarpos na época da safra é fonte de renda garantida para as populações locais. Do ponto de vista ambiental, a planta é uma das principais espécies fixadoras de dunas (Rufino 2004). Por ser uma importante população natural e encontrar-se em perigo devido a diversas ações antrópicas, se faz necessário sua proteção e conservação.

Alguns trabalhos (Lima 1996; Vieira *et al.* 2014; Zuffo, 2014; Moreira *et al.* 2016) tem identificado o cajuí da restinga piauiense como *A. microcarpum*, descrito por Ducke (1922), como um grupo distinto de *A. occidentale*, diferindo do cajueiro comum pela textura mais coriácea de suas folhas, pecíolo mais achatado, nervura central fortemente proeminente, inflorescência menos densa, fruto pequeno e hipocarpo mais ácido. Mitchell e Mori (1987) consideram que este táxon se trata de um sinônimo de *A. occidentale*. Porém, estes autores não realizaram estudo sobre a classificação infraespecífica da espécie. Assim como estes autores, Silva-Luz e Pirani (2017) também classificaram *A. microcarpum* como heterótipo de *A. occidentale*. Cunha (2002), por sua vez, utilizando sequências dos genes rDNA 18S para fazer a reconstrução filogenética do gênero, concluiu que *A. microcarpum* é um ecótipo ou variedade botânica de *A. occidentale*.

Até o presente, não há consenso sobre a distinção entre *A. occidentale* e *A. microcarpum*. *A. occidentale* tem grande amplitude de variação morfológica principalmente na cor, forma, tamanho e consistência do pedúnculo. *A. microcarpum* tem sido a espécie mais ocorrente nos estados do Ceará, Maranhão, Pará e Piauí (Andrade *et al.* 2012; Barros *et al.* 1999).

Estudos sobre a variação genética baseados em amostras de populações do campo ainda são escassos. O conhecimento da variabilidade genética diretamente do DNA, possível através do uso de marcadores moleculares tem possibilitado muitos avanços na pesquisa científica, especialmente em estudos de diversidade genética. Entre os marcadores moleculares baseados em PCR, destaca-se o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) por apresentar elevada porcentagem de polimorfismo, baixo custo e eficiente diferenciação entre indivíduos (Gupta *et al.* 1994; Reddy, Sarla & Siddiq 2002). Pesquisas desenvolvidas com plantas usando marcadores ISSR mostram seu potencial para estudo de diversidade genética (Dasmohapatra *et al.* 2014; Borges 2015), delimitação de espécies (Wood & Nakazato 2009; Rodrigues *et al.* 2014), bem como para o uso em genética da conservação (Brandão 2008).

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo caracterizar e comparar a diversidade, estrutura e diferenciação genética de populações naturais de *A. occidentale* (caju) e *A. microcarpum* (cajuí) ocorrentes predominantemente no litoral piauiense utilizando marcadores moleculares ISSR, além de contribuir para a delimitação taxonômica desses táxons, e manejo e conservação de plantas nativas com potencial social, ambiental e econômico.

Materiais e Métodos

Material vegetal

Para este estudo foram coletadas amostras em locais selecionados da Microrregião do Litoral Piauiense (Parnaíba: Labino, Pedra do Sal e Rosápolis; Ilha Grande: Cal e Tatus; Cajueiro da Praia e Cocal) e Microrregião do Baixo Parnaíba Piauiense (Luzilândia). As populações de plantas nas localidades Rosápolis, Cocal, Luzilândia e Cajueiro da Praia foram identificadas como caju (*A. occidentale*), enquanto nas localidades Labino, Pedra do Sal, Cal e Tatus as populações foram identificadas como cajuí (*A. microcarpum*) (Fig.1) (Tab. 1). A coleta foi realizada nos períodos de agosto a outubro de 2015, período de floração e frutificação das espécies. As folhas jovens de 30 indivíduos de cada população foram armazenadas e estocadas em sílica-gel.

Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir do método descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações para atingir uma boa qualidade de DNA. Aproximadamente 20 mg de folhas jovens foram maceradas com tampão de extração na proporção de 800 µL de CTAB 2X e 4 µL β-mercaptetanol [CTAB 2%, Tris-HCL 0,1 mM (pH 8,0), EDTA 20 mM (pH 8,0), NaCl 1,4 M e β-mercaptetanol 2%] previamente aquecidos em banho-maria a 60 °C por 10 min. Em seguida foi adicionado tampão de extração e acondicionados em banho-maria a 60°C por 20 min. Após resfriamento das amostras, foram adicionados 800 µL de solução clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e posteriormente homogeneizados em agitador por 1 hora e centrifugado por 10 min a 13000 rpm. Parte do sobrenadante resultante (~400 µL) foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 2/3 do volume de isopropanol (~300 µL), misturando-se cuidadosamente por inversão e permanecendo em *overnight* no freezer. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 min, ocorrendo assim a precipitação do DNA. Ao *pellet* foi adicionado 1000 µL de etanol 70% seguido de centrifugação por 5 min a 13000 rpm, processo este realizado três vezes. O DNA obtido foi ressuspensionado em 100 µL de solução de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) e EDTA 0,1 mM] por 24 horas na bancada ou até que o *pellet* homogeneizasse na solução.

Amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro *BioSpec-nano* e o DNA foi diluído a uma concentração de 25 ng/μL. Para confirmação quanto à integridade, algumas amostras foram quantificadas utilizando o método de visualização por bandas de eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 1%, preparado com tampão TBE 1x (Tris-Borato-EDTA) e corado com *GelRed-Biotium*® a 1x. DNA fago λ na concentração de 100 ng/μL foi utilizado para comparação.

Reação em cadeia de polimerase (PCR) e Seleção de primers ISSR

A reação de PCR foi feita com o kit *TopTaq MasterMix* (*Qiagen*). O mix foi preparado com volume total 10 μL de acordo com as seguintes condições: 4 μL de *TopTaq polimerase*, 4,7 μL de H₂O free RNase, 0,8 μL do *CoralLoad*, 0,5 μL *primer*. Para a reação de PCR foi utilizado 9 μL do mix e 1 μL de DNA genômico (25 ng/μL). As reações de amplificação envolvendo repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão foram realizadas em termociclador *Thermal Cyclers Tprofessional* (*Biometria*®) com capacidade para 96 amostras adotando os seguintes parâmetros: uma desnaturação inicial a 94 °C por 1,5 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento com temperatura dependente do *primer* por 45 segundos, extensão a 72 °C por 1,5 minutos; uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, em corrente constante de 100 V. Para corrida eletroforética foi utilizado 10 μL do produto da PCR com 3 μL de *BLUE* e 2 μL de *GelRed-Biotium*® a 1x. As mesmas quantidades foram usadas para o grupo controle. Em todos os géis foram aplicados marcador de peso molecular conhecido para fins de comparação, na canaleta de cada gel foi aplicado 5 μL do (*Ladder*) 100 pb (*Invitrogen*). Em seguida, os géis foram visualizados em transluminador UV (*Loccus Biotecnologia*) e fotodocumentados.

Foram realizados testes com 18 *primers* ISSR de 14-20 nucleotídeos de comprimento para otimização e seleção dos *primers* com melhor padrão de amplificação (Tab. 2). Nestes testes foram utilizados dois indivíduos de cada local de coleta, para verificar a presença de polimorfismo. Após estabelecido os primers com melhor padrão de amplificação, a técnica foi empregada para 30 indivíduos de cada população.

Análise dos dados

Os fragmentos gerados pela amplificação do DNA genômico de cada amostra foram usados como dados a serem interpretados neste estudo. A partir da leitura cuidadosa dos padrões eletroforéticos, realizadas manualmente, foram considerados apenas os fragmentos robustos e inequívocos, sendo descartados aqueles com fraca intensidade ou baixa definição. A análise dos géis leva em consideração que os fragmentos gerados por um mesmo *primer* e que ocupam a mesma posição são consideradas como pertencentes ao mesmo loco gênico, enquanto que os fragmentos ocupantes de posições diferentes são de locos distintos (Pessoni 2007). Cada fragmento foi designado como uma única característica e foi codificado pelo critério visual onde “1” indica presença do marcador e “0” indica ausência do marcador, para construção de uma matriz de dados binários, usada nas análises estatísticas descritas adiante.

A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* foi obtida pela razão entre o número de bandas polimórficas e o número total de bandas. Utilizando o software GenAlEx 6.502 (Peakall & Smouse 2012) foi calculada a porcentagem de polimorfismo por população (%P), obtida pela razão entre o número de bandas polimórficas na população e o número total de bandas. Outros parâmetros de diversidade genética calculados foram o Índice de Shannon (I), e Heterozigosidade Esperada (H_e), estimada como base em Nei (1978).

A avaliação da proporção da variabilidade genética encontrada que está entre e dentro das populações foi obtida pelo método mais comumente utilizado para dados de marcadores dominantes, a Análise de Variância Molecular (AMOVA) proposta por Excoffier, Laval & Schneider (2007), tal como implementada na GenAlEx 6.502 (Peakall & Smouse 2012), com base no cálculo do parâmetro Φ_{PT} (análogo ao F_{ST}), próprio para o cálculo de AMOVA usando marcadores dominantes. Também foram calculadas as estimativas de fluxo gênico (N_m) fornecidas pelo número de migrantes por geração e G_{ST} estimador análogo ao F_{ST} de Wright (1978) usado em análises de diferenciação genética. Valores de G_{ST} entre intervalos de 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25 e maior que 0,25 indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente. Estas análises foram realizadas utilizando o software POPGENE v, 1,31 (Yeh & Boyle 1999).

A divergência genética entre as populações foi investigada usando as distâncias genéticas e as identidades genéticas imparciais de Nei (1978). Esses dados foram obtidos no GenAlEx 6.502 (Peakall & Smouse 2012). Além disso foi construído um dendrograma baseado nas distâncias genéticas e realizado um estudo sobre a correlação genética (Teste de

Mantel) entre a distância geográfica e genética. Essas duas análises foram obtidas pelo software PAST 2.17c (Hammer *et al* 2001).

As Análises dos Coordenadas Principais (PCoA) foram conduzidas utilizando o software GenAlEx. 6.502 (Peakall & Smouse 2012) e PAST 2. 17c (Hammer *et al* 2001), enquanto a análise Bayesiana, para obtenção de agrupamentos genéticos foi feita utilizando o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000). Para determinar o número ideal de *clusters* (K) foram feitas simulações partindo do princípio que era possível a obtenção de qualquer número de *clusters* entre 1 e 12, sendo que para cada simulação foram feitas 10 repetições. Para esta análise foi utilizado o modelo com mistura (*admixture model*) e as frequências alélicas foram correlacionadas por 50.000 *burn-in* e 50.000 MCMC (Cadeia de Markov-Monte Carlo) repetições após *burn-in*. Para a determinação do K (número de agrupamentos genéticos) mais provável em relação aos propostos pela análise, foram utilizados os critérios sugeridos por Evanno *et al.* (2005), por meio do programa STRUCTURE HARVESTER v. 0.6.9 (Earl & Vonholdt 2012).

Resultados

Análises de diversidade genética

Dos 18 *primers* testados, cinco (UBC 813, UBC 825, UBC 847, UBC 860 e Many) foram selecionados e utilizados neste estudo. A seleção teve como critérios os *primers* que apresentaram o melhor padrão de amplificação em relação ao polimorfismo, qualidade e resolução das bandas (Tab. 3). A Fig. 2 mostra o padrão de amplificação do primer ISSR UBC 825 na população de Cal- Ilha Grande.

Os cinco *primers* selecionados geraram o total de 94 bandas (locos), com comprimento variando de 200 a 2000pb. Todos os *primers* apresentaram-se 100% polimórficos. O *primer* com menor número de locos polimórficos foi o UBC 825 (17) e o maior foram o UBC 847 e Many, com 20 locos cada (Tab. 3).

As porcentagens de locos polimórficos (%P) obtidas em cada uma das populações foram relativamente próximas, tendo maiores porcentagens em Pedra do Sal (PS) e Tatus (TU), com 67,02% e 63,83% respectivamente, e menores nas populações Cajueiro da Praia (CP), Labino (LA) e Luzilândia (LU), com 40,43%, 45,74% e 46,87%, respectivamente. As populações de Cocal (CL) e Cal (CA) foram semelhantes com 52,13% e Rosápolis (RO) teve

58,51% de porcentagem de polimorfismo. Estes resultados foram condizentes com os obtidos pelos estimadores de diversidade genética, onde se observa que os Índices de Shannon (I) e a Heterozigosidade esperada (He) foram maiores nas populações de Pedra do Sal (PS) e Tatus (TU) com valores 0,285(I); 0,180(He) e 0,261(I); 0,164(He), respectivamente. As populações de Cajueiro da Praia (CP), Labino (LA) e Luzilândia (LU) apresentaram os menores valores 0,166(I); 0,104(He), 0,170(I); 0,104(He) e 0,172(I); 0,103(He), respectivamente, e as populações de Cal (CA), Rosápolis (RO) e Cal (CL) apresentaram os valores de 0,227(I); 0,145(He), 0,216(I); 0,132(He) e 0,215(I); 0,137(He), respectivamente.

Os resultados indicaram que as três populações de cajuí localizadas em Pedra do Sal (PS), Tatus (TU) e Cal (CA) são as mais diversas internamente, enquanto Labino (LA) tem diversidade intrapopulacional parecida à das populações menos diversas de caju. Ou seja, as populações de cajuí tem uma gama de diversidade mais ampla do que as do caju (Tab. 4). Os valores médios dos parâmetros de diversidade genética são menores para as populações de *A. occidentale* (%P: 47,7%, I : 0,19, He : 0,12), contrastando com as de *A. microcarpum* (%P: 57,2%, I : 0,24, He : 0,15).

Análises de diferenciação genética e relação entre populações

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstraram que a maior variabilidade genética ocorre dentro das populações (78%) do que entre as populações (22%) (Fig. 3). Esse resultado revela que a variabilidade genética observada é predominantemente devida as diferenças entre os indivíduos pertencentes a mesma população, sendo menores as diferenças entre as populações. O valor do Índice de Fixação PhiPT foi de (0,217), evidenciando que existe diferenças genéticas entre as populações (Tab. 5).

Para melhor investigar as relações de diferença genética entre as populações, o índice de fixação PhiPT foi calculado entre cada par de populações e seu significado estimado usando um teste de permutação com 999 replicações. O nível de significância ($P \geq 0,001$) dos valores de PhiPT entre cada par de populações mostra que todas as populações são significativamente diferentes entre si (Tab. 6). O valor de G_{st} (0,149) indica moderada diferenciação genética entre as populações. Esses resultados corroboram com a existência de um nível elevado de fluxo de gênico, conforme demonstrado pelo valor do número de migrantes (N_m) (2,85).

A identidade genética de Nei (1978) variou de 0,936 (Cocal e Cal) a 0,994 (Luzilândia e Cajueiro da Praia), que por serem valores próximos a 1, mostram grau de similaridade genética entre as populações. A distância genética de Nei (1978), calculada para inferir a divergência genética entre populações variou de 0,006 a 0,067. O menor valor foi observado entre as populações (Cajueiro da Praia e Luzilândia) enquanto o maior valor foi observado entre os pares (Cal e Cocal) (Tab. 7).

O dendograma baseado na distância genética de Nei (1978), construído pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), mostrou que a população de Cocal (CL) se diferencia das demais populações, formando um grupo exclusivo. As populações de Cal (CA) e Pedra do Sal (PS) mostraram alta divergência genética em relação as demais populações, enquanto que as populações Luzilândia (LU) e Cajueiro da Praia (CP) foram as mais semelhantes. As demais populações foram próximas entre si, tais como Rosápolis (RO), Labino (LA) e Tatus (TU) (Fig. 4 e Tab. 7). A análise do dendograma revelou dois subgrupos principais, cujas composições mostraram que não há relação clara entre distância geográfica e distância genética. O teste de Mantel evidenciou ausência de correlação entre a distância geográfica e a distância genética ($r = -0,1858$; $P = 0,6066$).

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada com a matriz de distância de Nei (1978), com a finalidade de acrescentar mais uma vista dos dados além da fornecida pela análise de agrupamento UPGMA. Nestas ordenações (Figs. 5 e 6), os três primeiros eixos enquadram (87.7%) da variância total dos dados (Tab. 8), significando que os padrões mostrados no espaço dos três primeiros eixos são os de maior importância. Nestes três eixos do PCoA, as populações mais distintas são Cal (CA), Cocal (CL) e Pedra do Sal (PS) (Figs. 5 e 6). Destas três populações duas são de cajuí, reforçando que as populações de cajuí enquadram maior diversidade genética do que as populações de caju. O primeiro eixo tem mais da metade da variância total, portanto, a mais importante. A linha nas Figs. 5 e 6 representa a árvore de expansão mínima (MST), que liga cada ponto ao que é mais próximo de acordo com a matriz de distância de Nei (1978) usado para a PCoA. As ordenações reforçam a divergência das três populações de Cocal, Pedra do Sal e Cal, e as MST mostram a existência de relações mais próximas de Cal com Tatus e de Pedra do Sal com Rosápolis, as quais são também evidenciadas nos resultados da análise Bayesiana de estrutura. A análise de PCoA com todos os indivíduos das populações (Fig. 7), mostrou que as populações Rosápolis (RO), Luzilândia (LU), Cajueiro da Praia (CP) e Labino (LA) fazem parte de um mesmo agrupamento e as populações Cocal/Pedra do Sal e Tatus/Cal apresentam-se relativamente

isoladas das demais populações, resultados concordantes com as análises anteriores (Figs. 5 e 6).

Nas simulações feitas com o programa STRUCTURE com abordagem Bayesiana, o número de K (grupos genéticos) foi definido como quatro, pois este foi o valor de ΔK mais provável (Fig. 8). A distribuição das oito populações para K=4 demonstra que as populações Rosápolis (RO) e Pedra do Sal (PS) (em verde) pertencem ao mesmo grupo, no entanto essas populações tem mistura do seu genoma com o grupo em amarelo formado pelas populações Luzilândia (LU), Cajueiro da Praia (CP) e Labino (LA), onde a mistura é mais acentuada em Rosápolis (RO) que Luzilândia (LU). A população Cocal (CL) em azul é o grupo mais consistente com mistura mínima de genoma e as populações de Tatus (TU) e Cal (CA) fazem parte de um mesmo grupo (vermelho). Nas análises anteriores, a população Cocal (CL) apresentou maior distância genética em relação as outras populações, além disto, observa-se mistura de genoma com os indivíduos pertencentes aos grupos amarelo e verde (Fig. 9). Com base neste resultado, sugere que exista troca de alelos entre os grupos.

Discussão

Os marcadores ISSR mostraram elevado polimorfismo e bom desempenho na avaliação da diversidade genética das populações. Os cinco *primers* ISSR selecionados geraram um percentual de polimorfismo nos *primers* de 100%, um indicador bastante usado para quantificar a diversidade genética em populações de plantas (Borem & Caixeta 2009).

Foram observadas taxas de polimorfismo como valores próximos entre as populações de *A. occidentale* e *A. microcarpum* variando de 40,43-67,02%, evidenciando diversidade genética intrapopulacionais moderada a alta. As taxas de polimorfismo obtidas neste estudo mostram-se semelhantes as encontradas por Silva *et al.* (2017) em populações naturais de Cajazeiras (*Spondias mombin* L.) com taxa de diversidade genética variando de 0,58-61,21%.

Determinar a variabilidade genética em populações naturais é importante para o conhecimento de uma espécie, pois as informações de características genéticas podem ser úteis para vários fins, dentre eles podemos destacar predição do nível de conservação da espécie, auxílio na elaboração de estratégias de conservação e uso sustentável dos recursos genéticos disponíveis (Górski 2015). Marcadores ISSR têm sido aplicados com sucesso no estudo de caracterização de espécies de importância econômica, tais como em *Fragaria ananassa* Duch (Nunes *et al.* 2013), *Genipa americana* L. (Silva *et al.* 2014), *Psidium* spp.

(Oliveira *et al.* 2014), e *Passiflora cincinnata* Mast. (Carmo *et al.* 2017), com o propósito de determinar o relacionamento genético entre os indivíduos de uma espécie e possibilitar uma melhor identificação para conservação de germoplasma e desenvolvimento de novos cultivares.

O índice de diversidade Shannon (I) e Heterozigosidade esperada (He) tiveram resultados maiores nas populações de cajuí que nas populações de caju, concordando com as taxas de polimorfismos encontradas para as populações. Os valores encontrados para o He e I nas populações de *A. occidentale* e *A. microcarpum* são indicativos de moderada a alta diversidade genética a nível de população, uma vez que os índices variam de 0 a 1, sendo 0 considerado diversidade gênica nula e 1 diversidade gênica máxima (Giustina *et al.* 2014). Em outros estudos com populações naturais, tais como, os de Giustina *et al.* (2014) com *Theobroma speciosum* ($He= 0,167$ e $I= 0,254$) e Costa *et al.* (2015) com *Hancornia speciosa* Gomes ($He=0,180$ e $I= 0,260$), os resultados foram semelhantes.

O valor do coeficiente de diferenciação genética (Gst) entre as populações foi moderado. No teste AMOVA (Análise de Variância Molecular) esse nível de diferenciação genética entre as populações foi confirmada, evidenciando que a variabilidade genética é encontrada dentro das populações. Esses resultados foram consistentes com o valor de fluxo gênico representado pelo número de migrantes (Nm) registrado, onde valores de (Nm) maiores que 1 sugerem existir trocas gênicas entre as populações suficientes para prevenir a diferenciação entre elas devido à deriva genética (Slatkin & Barton 1989) evidenciando que existe trocas gênicas entre as populações.

A distância genética de Nei apresentou grande amplitude de variação, demonstrando diferenciação entre as populações, embora essa diferenciação não esteja relacionada à distância geográfica das populações, pois a correlação obtida pelo teste de Mantel entre a matriz de distância genética e matriz de distância geográfica não foi significativa. Esse resultado pode ser claramente observado pela população de Luzilândia (*A. occidentale*) que mesmo sendo a mais distante geograficamente das demais populações, aproximadamente 150 km, teve similaridade genética com a população de Cajueiro da Praia (*A. occidentale*). A população de Cocal (*A. occidentale*) que é mais próxima geograficamente de Luzilândia (*A. occidentale*) foi a mais distante, como pode ser observado no dendrograma da Fig. 4.

As Análises Bayesianas obtidas pelo *Structure* e a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostraram resultados concordantes com as análises anteriores, onde não é observado distinção genética clara entre as populações *A. occidentale* e as populações naturais de *A.*

microcarpum. Particularmente no caso da população de Rosápolis, há evidências de troca genética com mistura de dois agrupamentos genéticos. É altamente provável que as populações da região litorânea, ou seja, neste estudo, todas com exceção de Luzilândia e Cocal incluam plantas que contêm contribuições genéticas de populações naturais de *A. microcarpum* da restinga, uma vez que os povoamentos domesticados de *A. occidentale* provavelmente incluem espontaneamente plantas dispersas resultantes do cruzamento com plantas de restinga ocorrentes nas proximidades. A seleção informal por longos períodos de genótipos considerados superiores pelos agricultores locais e seu suposto transporte por longas distâncias pode ser provavelmente uma das razões por que não há correlação entre distância geográfica e genética, pois esses processos confundirão quaisquer padrões de isolamento por distância que os intercruzantes naturais produziriam. Segundo Mitchell e Mori (1987), cruzamentos em espécies simpátricas, por exemplo, *A. occidentale*, *A. humile* e *A. nanum* que ocorrem no planalto central brasileiro e que florescem no mesmo período, podem ocorrer por possuir poucas barreiras extrínsecas entre elas, o que explicaria a existência de indivíduos nas populações naturais que são intermediárias entre *A. occidentale* e *A. humile* e entre *A. humile* e *A. nanum*. Desta forma, não é impossível ocorrer o cruzamento de indivíduos de caju e cajuí nas populações estudadas.

A diferenciação genética entre *A. occidentale* e *A. microcarpum* reside principalmente em níveis diferentes de diversidade intrapopulacional e de divergência entre populações. As populações de *A. microcarpum* são mais diversas em todos os sentidos, e isto é tanto mais notável quando se tem em mente que a área geográfica dentro da qual as quatro populações de cajuí ocorrem é muito pequena em comparação com a área total coberta. Neste estudo infere-se que as populações naturais de *A. microcarpum* das restingas do Nordeste brasileiro representam um recurso de biodiversidade de grande importância. A seleção informal e científica de clones deve ter contribuído para este efeito, a população de Cocal, por exemplo, foi amostrada em uma pequena área de cultivo de pomares que haviam sido especificamente plantados usando clones modernos, de acordo com o agricultor local.

As trocas genéticas evidenciadas nas análises podem ser explicadas pelos agentes dispersores de pólen e frutos (Borges 2015). As espécies de *Anacardium* tem como agentes polinizadores, abelhas, morcegos, borboletas (Mitchell & Mori 1987), além de vespas e moscas, sendo as abelhas as melhores polinizadoras (Bhattacharya 2004). Duas espécies de abelhas, uma indígena (*Centris tarsata*) e outra exótica (*Apis mellifera*) foram identificadas como polinizadores potenciais de *A. occidentale* em estudo realizado no litoral do Ceará

envolvendo a biologia reprodutiva da espécie (Freitas & Paxton 1998). Paulino (1992) concluiu em seu estudo sobre avaliação entomófila no cajueiro que *Apis mellífera* é a espécie mais importante nesta cultura. Além disso a dispersão do fruto é feita por morcegos frugívoros (Mitchell & Mori 1987) e pode ser dispersa pelos rios, pois a castanha e pedicelo juntos podem flutuar na água (Johnson 1974).

Estudo realizado por Vieira *et al.* (2014), com base em dados morfométricos de folhas de *A. occidentale* e *A. microcarpum*, mostraram sobreposição em relação aos caracteres estudados, e embora esses caracteres possam ser utilizados para uma identificação prévia, faz-se necessário estudos ao nível molecular para uma confirmação, pois apenas caracteres morfológicos são susceptíveis a variação ambiental. Nascimento (2016) realizou estudo morfológico de dados vegetativos e florais com *A. occidentale* e *A. microcarpum*, concluindo que alguns caracteres podem servir como suporte para diferenciação entre os grupos, tais como: comprimento, espessura, largura da lâmina foliar, número de nervuras laterais, comprimento do pedicelo, comprimento da inflorescência, comprimento e diâmetro da drupa e comprimento do hipocarpo. Estudo citogenético realizado recentemente com populações destes dois táxons do litoral piauiense evidenciaram que as espécies analisadas apresentaram variação cromossômica, sendo que *A. occidentale* variou desde $2n=20$ a $2n=28$ e *A. microcarpum* $2n=26$ para algumas populações e variação de $2n=20$ e 22 para a população encontrada em Tatus (Ilha Grande-PI) (Santos 2016). De acordo com esses estudos observamos que as espécies *A. occidentale* e *A. microcarpum* apresentam diferenças significativas nas características morfológicas e citogenéticas de amostras obtidas de populações naturais (cajuí) e cultivadas (caju).

Análise da variabilidade genética de espécies nativas passou a ter um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais, visto que as populações naturais sofrem riscos tais como a coleta indiscriminada, destruição ou fragmentação de habitat, ruptura nas conexões ecológicas, alterações abióticas, ervas daninhas e pragas que provocam doenças (Light *et al.* 2003; Ribeiro & Rodrigues 2006). As populações de cajuí do litoral piauiense estão sendo ameaçadas pelos empreendimentos imobiliários que estão se instalando na região. A comercialização de castanhas e hipocarpos na época da safra e outros produtos são fonte de renda garantida para as populações locais. Do ponto de vista ambiental a planta é uma das principais fixadoras de dunas. Por ser um importante elemento da vegetação natural e encontrar-se em perigo devido a diversas ações antrópicas, se faz necessário sua proteção e conservação (Rufino 2004).

Neste trabalho, as populações estudadas não apresentaram uma separação genética precisa, com compartilhamento de alelos observados entre as populações, porém é sugerido que apesar de não se mostrem distintos os agrupamentos das populações das duas espécies, seria pragmaticamente desejável manter o uso da nomenclatura empregada aqui, o qual se baseia no fato de *A. microcarpum* seja um táxon natural, componente da restinga do Nordeste do Brasil, enquanto o nome *A. occidentale* seria melhor usado para se referir à constelação de formas domesticadas, e até mesmo naturalizadas a partir de pomares e quintas formais ou informais, cultivadas e selecionadas ao longo de séculos de exploração econômica.

Desta forma, conhecer mais detalhadamente a estrutura genética das populações naturais destas espécies de importância econômica, é fundamental, além disso os resultados indicam a necessidade de estratégias mais elaboradas para a conservação deste importante recurso genético representado pelas populações naturais dos cajuzeiros da restinga piauiense. Estudos complementares considerando aspectos fitogeográficos, seriam necessários para uma melhor compreensão da delimitação entre esses dois táxons.

Agradecimentos

À Prefeitura de Parnaíba, Piauí, pelo apoio por meio do Mac-Doubles Fernandes do Nascimento de Apoio a Ciência, Tecnologia e Inovação, e o Sistema para autorização e informação da Biodiversidade (ICMBio-SISBIO).

Referências

- Almeida AS. 2009. Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de pedúnculos de cajuzeiros e frutos de umbuzeiros nativos do semiárido do Piauí. 2006. Tese doutorado em Agronomia, Rio Grande do Norte.
- Andrade IM *et al.* 2012. Diversidade de Fanerógamas do Delta do Parnaíba - Litoral Piauiense. In: Guzzi A. Biodiversidade do Delta do Parnaíba: litoral piauiense. Parnaíba, EDUFP.
- Barros LM. 1991. Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas multivariadas. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Brasil.
- Barros LM, Paiva JR, Cavalcante, JJV. 1999. Recursos genéticos de cajueiro: situação atual e estratégias para o futuro. In: Queiroz MA, Goedert CO, Ramos SRR Embrapa,

- Petrolina. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. 1-22.
- Bhattacharya, A. 2004. Flower visitors and fruit set of *Anacardium occidentale*. *Annales Botanici Fennici*. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Borem A, Caixeta ET. 2009. Marcadores Moleculares. 2nd. Edn. Viçosa, Editora UFV.
- Borges ANC. 2015. Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium* spp.) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, Brasil.
- Brandão MM. 2008. Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor fragmento no sul de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Carbajal ACR, Silva Junior N. 2003. Castanha de caju: recomendações práticas para a melhoria da qualidade. Fortaleza: Sebrae-CE/Embrapa Agroindústria Tropical, p. 16.
- Carmo TVB, Martins LSS, Musser RS, Silva MM, Santos JPO. 2017. Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. Based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. *Revista Caatinga*, 30: 68-77.
- Costa DFD, Vieira FDA, Fajardo CG, Chagas KPTD. 2015. Genetic diversity and ISSR initiators selection in a natural population of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 37(4):970-976.
- Crespo MFV, Souza LI. 2014. Cajuí: boas práticas e manejo sustentável. Parnaíba.
- Cunha RMS. 2002. Filogenia Molecular em *Anacardium* (Anacardiaceae): utilização do gene da subunidade pequena do RNA ribossômico (SSU rRNA). Dissertação de Mestrado, UniFortaleza.
- Dasmohapatra R, Rath S, Pradhan B, Rout GR. 2014. Molecular and agromorphological assessment of cashew (*Anacardium occidentale* L.) genotypes of India. *Journal of Applied Horticulture*, Minnesota 16: 215-221.
- Ducke A. 1922. Plantes nouvelles ou peu connues de la region Amazonienne. *Archivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Earl DA, Vonholdt BM. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611 – 2620.

- Excoffier L, Laval G, Schneider SL. 2007. Arlequin version 3.11: a software for population genetic data analysis. Geneva: University of Geneva.
- Freitas B, Paxton R. 1998. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris trasata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brasil. *Journal of Applied Ecology* 35:109-121.
- Giustina LD *et al.* 2014. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). *Genetics and molecular Research* 13(2):3510-3519.
- Górski F. 2015. Seleção de *primers* ISSR e estrutura genética populacional de *Baccharis crispa* SPRENG. (Asteraceae) do sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, UNICENTRO, Brasil.
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 9.
- Johnson D. 1974. O caju do Nordeste do Brasil: um estudo geográfico. Fortaleza: ETENE, p.169.
- Johnson DV. 1973. The botany, origin and spread of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of plantation crops, Kasaragod* 1: 1-7.
- Light MHS *et al.* 2003. The impact of climatic, edaphic and physiographic factors on the population behavior of selected temperate and tropical orchids. In: DIXON, K.W. *Orchid Conservation. Natural History Publication* 159 -182.
- Lima PRA *et al.* 1996. Avaliação agrônômica de fruteiras nativas do Meio-Norte do Brasil. *Embrapa Meio-Norte-Séries anteriores (INFOTECA-E)* 1-3.
- Lima VPMS. 1986. Fruteiras: uma opção para o reflorestamento do Nordeste. Fortaleza, BNB/ETENE.
- Lima VPMS. 1988. Botânica. In: Lima VPMS. *A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil.* Fortaleza, BNB/ETENE. p. 15-61.
- Mitchell JO, Mori SA. 1987. The cashew an its relatives (*Anacardium occidentale* L.). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 42: 1-76.
- Moreira FJC, Silva MAP, Medeiros Filho, S. 2016. Germinação e crescimento inicial de cajuí (*Anacardium microcarpum* DUCKE) em função do tamanho das sementes e do tempo de embebição. *Cadernos de Cultura e Ciência* 15: 19-28.

- Nascimento JDO. 2016. Comparação morfológica entre *Anacardium microcarpum* Ducke. e *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) no litoral Piauiense, Brasil. Universidade Federal do Piauí.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nunes CF, Ferreira JL, Generoso AL, Dias MSC, Pasqual M, Cançado GMA. 2013. The genetic diversity of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) hybrids based on ISSR markers. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35: 443-452.
- Oliveira NNS, Viana AP, Quintal SSR, Paiva CL, Marinho CS. 2014. Analysis of genetic distance between accesses of the gender *Psidium* by route markers ISSR. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36(4):917-923.
- Paulino, FDG. 1992 Polinização entomófila em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no litoral de Pacajus - CE. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pessoni L. 2007. Estratégias de análise da diversidade em germoplasma de cajueiro (*Anacardium spp.* L.). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- Pritchard JK, Stephens, M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Santos VMA. 2016. Estudo citogenético de morfotipos de *Anacardium occidentale* l. do litoral piauiense, Brasil. Universidade Federal do Piauí.
- Silva AVC, Freire KCS, Lédo AS, Rabbani AR. 2014. C. Diversidade e estrutura genética de acessos brasileiros de jenipapo (*Genipa americana* L.). *Scientia Agricola. Piracicaba* 71: 387- 393.
- Silva BM, Rossi AAB, Tiago AV, Schmitt KFM, Dardengo JFE, Souza SAM. 2017. Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. *Genetics and molecular research: GMR* 16.
- Silva-Luz CL, Pirani JR, *Anacardiaceae* In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4381>>. Acesso em: 06 mar. 2017.
- Slatkin, M, Barton, NH. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Ribeiro RA, Rodrigues FM. 2006. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 5.

- Rodrigues JF, *et al.* 2014. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C. mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. *Plant Systematics and Evolution* 301: 1345-1359.
- Rufino MSM. 2004. Qualidade e potencial de utilização de cajuís (*Anacardium spp*) oriundos da vegetação litorânea do Piauí. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- Rufino MSM, Corrêa MPF, Alves RE, Barros LM, Leite LAS. 2007. Suporte técnico para a exploração racional do cajuzeiro. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará: Fortaleza. 7:30.
- Usaid B. 2006. Análise da indústria de castanha de caju: inserção de micro e pequenas empresas no mercado internacional. São Paulo 1: 1-174.
- Vieira M, Mayo SJ, Andrade IM. 2014. Geometric morphometrics of leaves of *Anacardium microcarpum* Ducke and *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) from the coastal region of Piauí, Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 37: 315-327.
- Wood, TE, Nakazato, T. 2009. Investigating species boundaries in the *Giliopsis* group of *Ipomopsis* (Polemoniaceae): Strong discordance among molecular and morphological markers. *American Journal of Botany*. New York, 96:853-861.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 4: Variability within and among Natural Populations. Chicago: University of Chicago Press,
- Yeh FC, Boyle, TJB. 1999. Popgene v. 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population analysis. Edmonton: University of Alberta and Centre for International Forestry Research.
- Zuffo AM *et al.* 2014. Posição e profundidade de semeadura na emergência e desenvolvimento inicial de mudas de *Anacardium microcarpum* Ducke. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 9: 556-561.

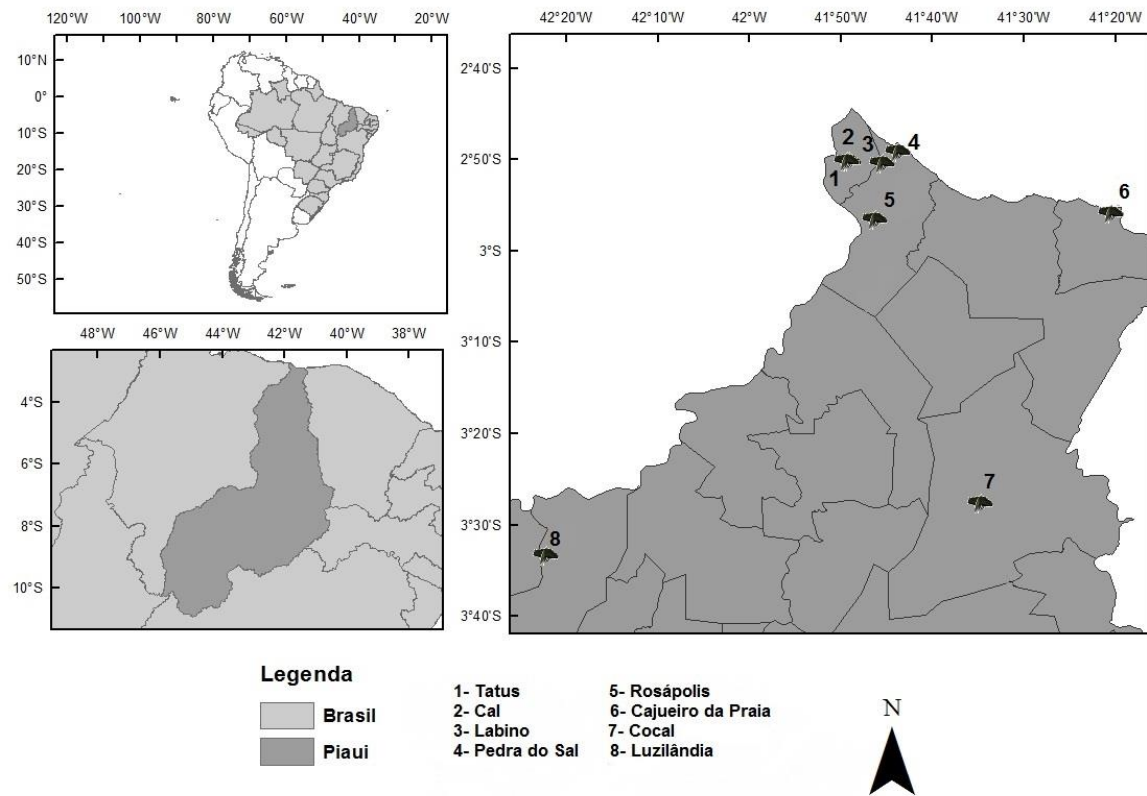


Figura 1. Área de estudo das populações de *Anacardium occidentale* L. (caju) e *Anacardium microcarpum* Ducke (cajuí).

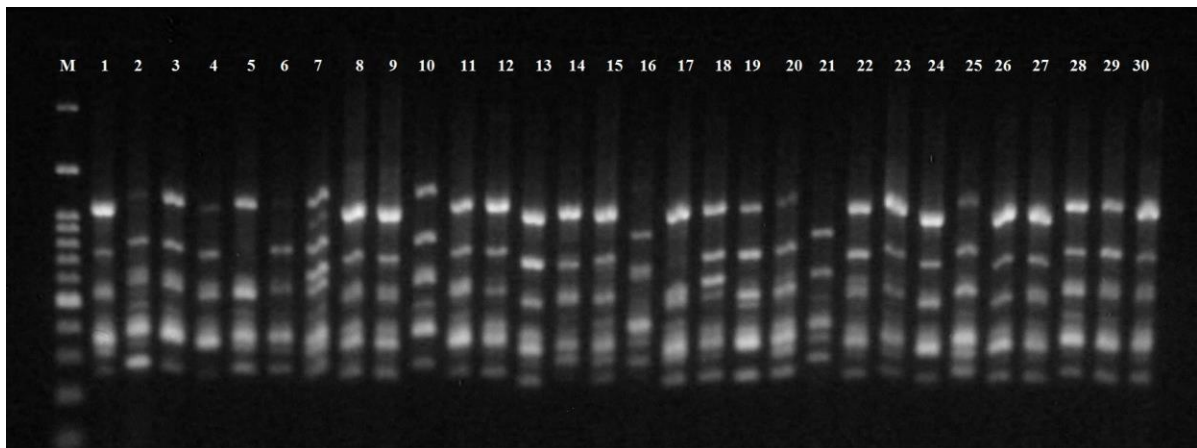


Figura 2. Gel de agarose com o padrão de amplificação do primer ISSR UBC 825, nos 30 indivíduos da população de *Anacardium microcarpum* Ducke, provenientes de Cal, município de Ilha Grande, Piauí. M-marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb.

Análise de Variância Molecular - AMOVA

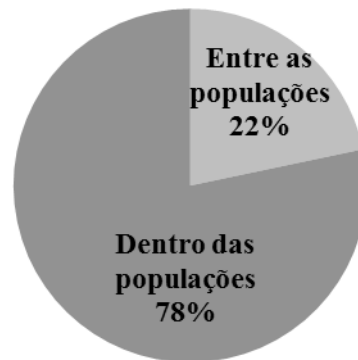


Figura 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre e dentro das populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke ocorrentes na microrregião e mesorregião do Piauí.

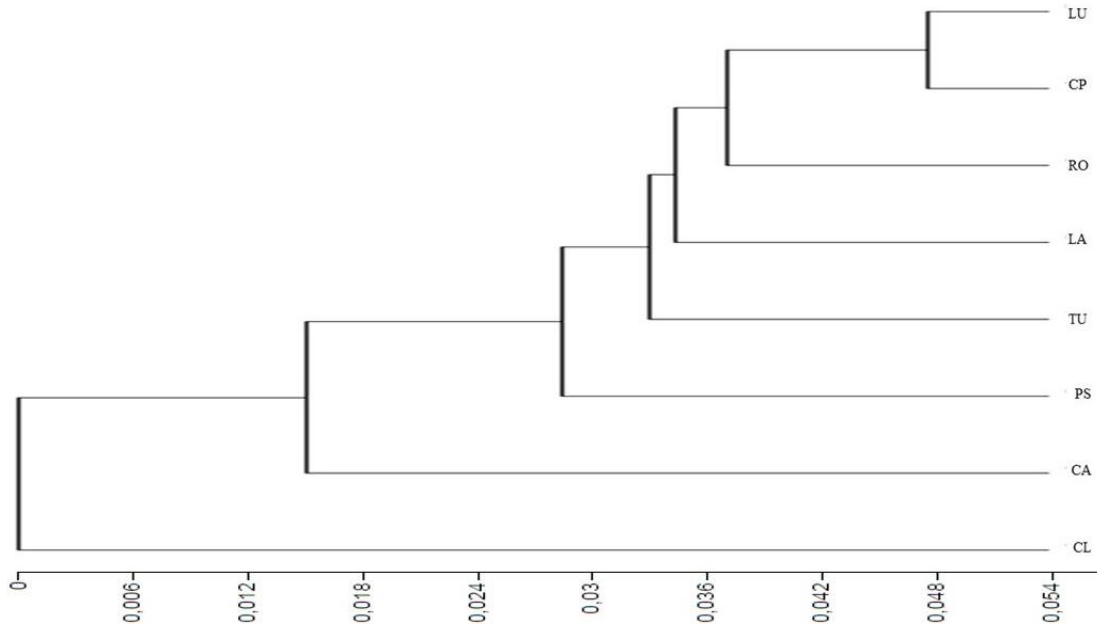


Figura 4. Dendrograma obtido pelo método de análise de agrupamento UPGMA com base na distância de Nei (1978) das populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.

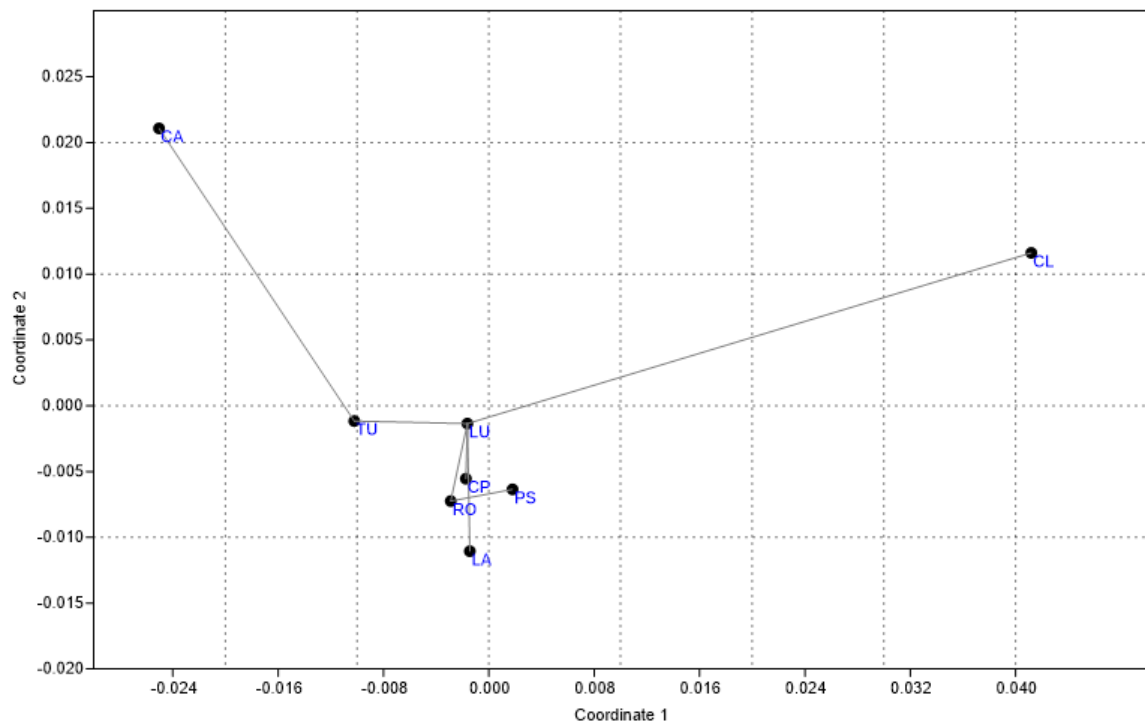


Figura 5. Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as oito populações do espaço dos eixos 1 (56.94% variância) e 2 (19.26% variância). A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.

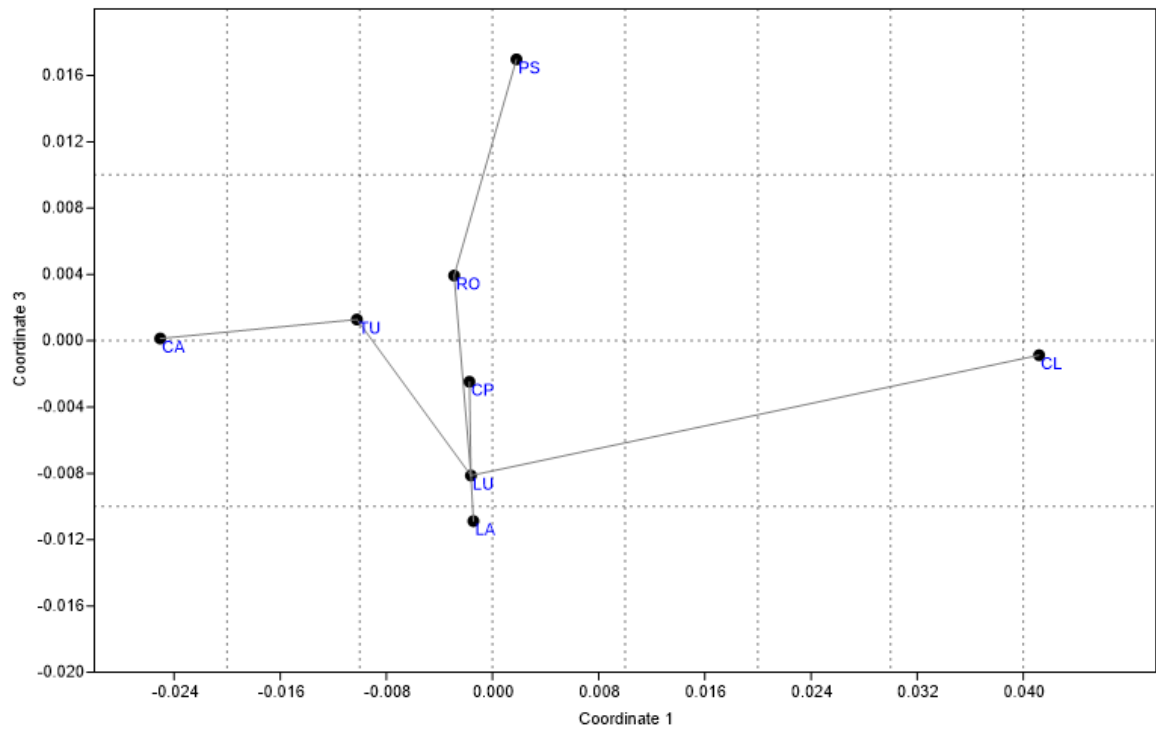


Figura 6. Ordenação de uma Análise de Coordenadas Principais, mostrando as oito populações do espaço dos eixos 1 (56.9% variância) e 3 (11.6% variância). A linha representa a árvore de expansão mínima (MST) entre as populações. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.

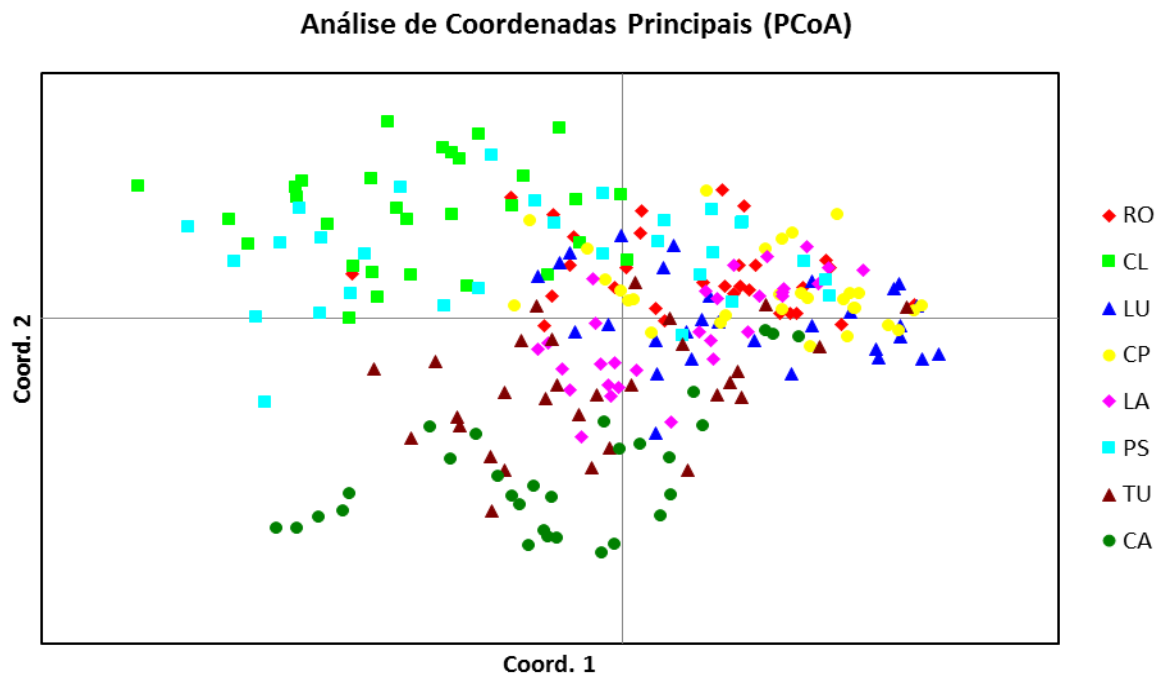


Figura 7. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das populações de *Anacardium occidentale* e *Anacardium microcarpum* mostrando a distribuição de todos os indivíduos. Calculado com Genalex 6.502 (Peakall & Smouse 2012). RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.

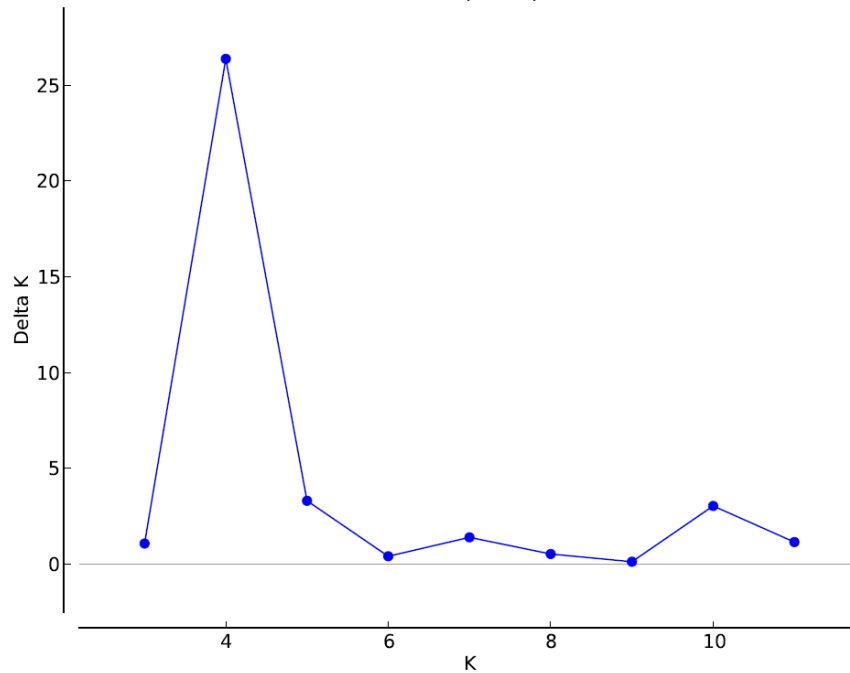


Figura 8. Determinação do número ótimo de K (grupos genéticos) em *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke pelo método Bayesiano usando o critério de otimização Delta K. O ponto de inserção entre o maior valor no eixo Y como o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos).

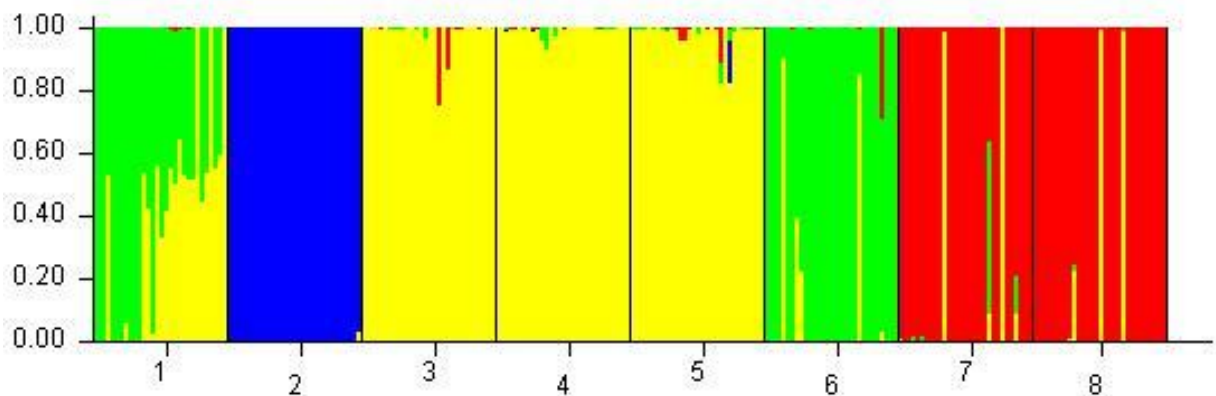


Figura 9. Estrutura genética das populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* como divisão de quatro grupos genéticos (K=4) obtidos pela análise Bayesiana. 1- Rosápolis, RO; 2- Cocal, CL; 3- Luzilândia, LU; 4- Cajueiro da Praia, CP; 5- Labino, LA; 6- Pedra do Sal, PS; 7- Tatus, TU; 8- Cal, CA.

Tabela 1. Dados das populações amostradas de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke.

Sigla	Localidades	Coordenadas	NI	Populações	Voucher
RO	Rosápolis, Parnaíba	02°56'34,0"S 4°46'21,9"W	30	<i>A. occidentale</i>	3587
CL	Cocal	03°27'42,6"S 41°34'53,2"W	30	<i>A. occidentale</i>	3584
LU	Luzilândia	03°33'26"S 42°22'26,0"W	30	<i>A. occidentale</i>	3592
CP	Cajueiro da Praia	04°31'53,0"S 41°21'25"W	30	<i>A. occidentale</i>	3588
LA	Labino, Parnaíba	02°50'27,5"S 41°45'39"W	30	<i>A. microcarpum</i>	3586
PS	Pedra do Sal, Parnaíba	02°49'14,5"S 41°43'56,2"W	30	<i>A. microcarpum</i>	3589
TU	Tatus, Ilha Grande	02°50'14"S 41°49'28"W	30	<i>A. microcarpum</i>	3590
CA	Cal, Ilha Grande	02°50'13,0"S 41°49'17"W	30	<i>A. microcarpum</i>	3591

Tabela 2. Oligonucleotídeos de marcador molecular ISSR testados e suas respectivas sequências 5' – 3'. Bases: A - Adenina, T - Timina, C - Citosina, G - Guanina, Y - C ou T, R - A ou G.

Primer UBC	Sequência (5' - 3')	Primer UBC	Sequência (5' - 3')
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	UBC 847	CACACACACACACARC
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	UBC 853	TCTCTCTCTCTCTCTR
UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	UBC 860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA
UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTT	UBC 899	CACACACACACARG
UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTA	BECKY	CACACACACACACAYR
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCG	MANY	CACCACCACACRC
UBC 825	ACACACACACACACT	MAO	CTCCTCCTCCTCRC
UBC 843	CTCTCTCTCTCTCTRA	OMAR	GAGGAGGAGGAGRC
UBC 844	CTCTCTCTCTCTCTTRC	TERRY	GTGGTGGTGGGTRC

Tabela 3. Relação de iniciadores selecionados para geração de polimorfismos de ISSR. ^a Sequências dos marcadores ISSR, ^b Temperatura de anelamento, ^c Número Total de Locos, ^d Número Locos Polimórficos, ^e Porcentagem de polimorfismo por *primer*. R= A/G.

<i>Primers</i>	Sequência ^a	Ta(°C) ^b	NTL ^c	NLP ^d	fp(%) ^e
813	[(CT) ₈ T]	50,4	19	19	100
825	[(AC) ₈ T]	56,0	17	17	100
847	[(CA) ₈ RC]	54,0	20	20	100
860	[(TG) ₈ RA]	52,0	18	18	100
Many	[(CAC) ₄ RC]	50,0	20	20	100
Total			94	94	100

Tabela 4. Estimativas de diversidade genética das oito populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke.; N: número de locos polimórficos; %P: porcentagem de locos polimórficos; *I*: Índice de diversidade Shannon; *He*: Heterozigosidade Esperada. Dados representam os valores médios ± erro padrão (desvio padrão da média).

Populações	N	%P	<i>I</i>	<i>He</i>
Rosápolis	55	58,51%	0,216 ± 0,023	0,132 ± 0,016
Cocal	50	52,13%	0,215 ± 0,026	0,137 ± 0,018
Luzilândia	45	46,87%	0,172 ± 0,022	0,103 ± 0,014
Cajueiro da Praia	38	40,43%	0,166 ± 0,024	0,104 ± 0,016
Labino, Parnaíba	43	45,74%	0,170 ± 0,023	0,104 ± 0,015
Pedra do Sal, Parnaíba	63	67,02%	0,285 ± 0,025	0,180 ± 0,017
Tatus, Ilha Grande	60	63,83%	0,261 ± 0,025	0,164 ± 0,017
Cal, Ilha Grande- PI	50	52,13%	0,227 ± 0,026	0,145 ± 0,018
Média	50,5	53,46%	0,214	0,157

Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) com todas as populações de *Anacardium occidentale* L.e *Anacardium microcarpum* Ducke tratados como um mesmo grupo.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Variância (%)
Entre populações	7	576,54	2,5	22
Dentro de populações	232	2051,43	8,8	78

Índice de Fixação PhiPT: 0,217 (P≥0,001)

Tabela 6. Valores do índice de fixação PhiPT, entre pares de populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke. e seu significado estatístico, baseado em teste de permutação com 999 replicações. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.

	RO	CO	LU	CP	LA	PS	TU	CA
RO	0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
CL	0.286	0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
LU	0.137	0.278	0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
CP	0.160	0.311	0.068	0	0.001	0.001	0.001	0.001
LA	0.191	0.315	0.146	0.248	0	0.001	0.001	0.001
PS	0.137	0.242	0.198	0.193	0.218	0	0.001	0.001
TU	0.158	0.279	0.156	0.184	0.202	0.156	0	0.001
CA	0.250	0.329	0.218	0.263	0.266	0.241	0.160	0

Tabela 7. Estimativas de identidade (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) entre as populações de *Anacardium occidentale* L. e *Anacardium microcarpum* Ducke. RO: Rosápolis, CL: Cocal, LU: Luzilândia, CP: Cajueiro da Praia, LA: Labino, PS: Pedra do Sal, TU: Tatus, CA: Cal.

	RO	CL	LU	CP	LA	PS	TU	CA
RO		0,952	0,985	0,983	0,980	0,982	0,980	0,963
CL	0,049		0,956	0,953	0,951	0,954	0,948	0,936
LU	0,015	0,045		0,994	0,987	0,974	0,983	0,967
CP	0,017	0,048	0,006		0,977	0,976	0,980	0,963
LA	0,020	0,050	0,013	0,023		0,972	0,977	0,959
PS	0,018	0,047	0,026	0,024	0,029		0,976	0,959
TU	0,020	0,054	0,017	0,020	0,023	0,024		0,971
CA	0,037	0,067	0,033	0,038	0,042	0,042	0,030	

Tabela 8. Autovalores (Eigenvalues) da Análise de Coordenadas Principais, usando a distância de Nei (1973).

Eixo	Autovalor	Autovalor em porcentagem	Autovalor em porcentagem cumulativa
1	0,0024475	56,94	56,94
2	0,0008277	19,26	76,2
3	0,0004963	11,55	87,75
4	0,0002389	5,56	93,31
5	0,0001629	3,79	97,1
6	6,540E-05	1,52	98,62

ANEXO I

ACTA BOTANICA BRASILICA JOURNAL

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope of the journal

Acta Botanica Brasilica (*Acta bot. bras.*) is the official journal of the Sociedade Botânica do Brasil (Botanical Society of Brazil, SBB) and was founded in 1987. Since 1998, the journal publishes four issues per year. Experimental, theoretical and applied papers on all aspects of plant (including algae) and fungi biology are welcome. The submitted manuscript or its essential content must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. Contributions should be substantial, written in English and show general interest. Manuscripts that report aspects of local interest are discouraged unless the implications of the findings are wide-reaching. Manuscripts with agronomic subjects are expected to contain a substantial amount of basic plant biology.

There is no fee for submission and review articles.

Why publish in Acta Botanica Brasilica?

- *Acta bot. bras.* is an indexed, open-access, peer-reviewed journal devoted to publishing high quality research in Plant Biology.
- There is no cost for publication.
- All manuscripts published by *Acta bot. bras.* are open-access, maximizing the impact of your research.
- The submissions are peer-reviewed by at least two experts who evaluate scientific quality and novelty.
- Our review process is very efficient. It will only take about two months for the first decision on your manuscript.
- The manuscripts are advertised to all members of the SBB, available in the journal website, in the SciELO database and in social media.
- *Acta bot. bras.* is indexed in Scopus and Web of Science among others.
- Increasing impact factor: *Acta bot. bras.* IF has been increasing in the last evaluations (from 0.374 in 2012 to 0.545 in 2014).

Language editing

If English is not your first language, it is strongly recommended to have your manuscript edited for language before submission. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. Authors are liable for all costs associated with such services.

Types of articles

Standard research papers (ORIGINAL ARTICLES) should not normally exceed twelve printed pages, except for REVIEWS (which may not exceed 25 printed pages). Reviews are solicited by the editors, but authors are also encouraged to submit potential topics for consideration. Opinion papers (VIEWPOINTS), METHODS and SHORT COMMUNICATIONS are also welcome and should not exceed five printed pages. To estimate the number of printed pages, consider that each page of text contains about 500-700 words.

Summary of submission processes

Submission management and evaluation of submitted manuscripts will involve the Journal's online manuscript submission system. The manuscript text should be prepared in English (see **PREPARING THE ARTICLE FILE** below for details) and submitted online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/abb-scielo>). Figures, tables and other types of content should be organized into separate files for submission (see **Preparing Tables, Figures and Supplementary material** below for details). If you are using the online submission system for the first time please go to the login page and generate a login name and password after clicking on the “**New user - register here**” link. If you are already registered but need to be reminded of your login name or password please go to the login page and inform your email in “**password help**”. Please never create a new account if you are already registered. If you are unable to access our web-based submission system, please contact the Editorial Office (acta@botanica.org.br)

Cover letter

All manuscripts must be submitted with a cover letter, which should include an approximately 80 word summary of the scientific strengths of the paper that the authors believe qualify it for consideration by *Acta Botanica Brasilica*. The cover letter should also include a statement declaring that the manuscript reports unpublished work that it is not under active consideration for publication elsewhere, nor been accepted for publication, nor been published in full or in part (except in abstract form).

Preparing the article file

(Please consult a last issue of **Acta Botanica Brasilica** for layout and style)

All manuscripts must follow these guidelines: the text should be in Times New Roman font, size 12, double-spaced throughout and with 25 mm margins; the paper size should be set to A4 (210 x 297 mm). All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. For text files .doc, .docx and .rtf are the only acceptable formats. Files in Adobe® PDF format (.pdf files) will not be accepted. When appropriate, the article file should include a list of figure legends and table heads at the end. This article file should not include any illustrations or tables, all of which should be submitted in separate files.

The **first page** should state the type of article (Original Article, Review, Viewpoint, Method or Short communication) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (1, 2, 3 etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. Only one corresponding author should be indicated with an asterisk and should Always be the submitting author. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the superscript number where appropriate. The address must be synthetic, just enough to send a letter. Titles and positions should not be mentioned. This information is followed by the e-mail address of the corresponding author.

The **second page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 200 words in a single paragraph without references. The Abstract should outline the essential content of the manuscript, especially the results and discussion, highlighting the relevance of main findings. The Abstract should be followed by between five and ten **Key words**. Note that essential words in the title should be repeated in the key words.

Original articles should be divided into sections presented in the following order:

Title page

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Acknowledgements

References

Tables and Figure legends

Supplementary Data (if applicable)

Material and Methods and **Results** should be clear and concise. The **Discussion** section should avoid extensive repetition of the results and must finish with some conclusions. This section can be combined with results (**Results and Discussion**), however, we recommend authors consult the Editorial Board for a previous evaluation.

Plant names must be written out in full in the abstract and again in the main text for every organism at first mention but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* e *H. stilbocarpa*). The authority (e.g., L., Mill., Benth.) is required only in Material and Methods section. Use The International Plant Names Index (www.ipni.org) for correct plants names. Cultivars or varieties should be added to the scientific name (e.g. *Solanum lycopersicum* 'Jumbo'). Authors must include in Material and Methods a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined.

Abbreviations must be avoided except for usual cases (see recent issues) and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Non-conventional abbreviations should be spelled out at first mention.

Units of Measurement. *Acta bot. bras.* adopts the *Système International d'Unités* (SI). For volume, use the cubic metre (e.g. $1 \times 10^{-5} \text{m}^3$) or the litre (e.g. 5 μL , 5 mL, 5 L). For concentrations, use μM , $\mu\text{mol L}^{-1}$ or mg L^{-1} . For size and distance use meters (cm, mm, μm , etc) and be consistent in the manuscript.

Numbers up to nine should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals unless they are starting sentences.

Citations in the text should take the form of Silva (2012) or Ribeiro & Furr (1975) or (Mayer & Wu 1987a; b; Gonzalez 2014; Sirano 2014) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by *et al.* (e.g. Simmons *et al.* 2014). If two different authors have the same last name, and the article have the same year of publication, give their initials (e.g. JS Santos 2003). Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and last name of the person concerned (e.g., RA Santos unpubl. res.).

References should be arranged alphabetically based on the surname of the author(s). Where the same author(s) has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same citation in the text. Please provide DOI of 'in press' papers whenever possible.

For papers with **six** authors or fewer, please give the names of *all* the authors. For papers with **seven** authors or more, please give the names of the *first three* authors only, followed by *et al.*

Please follow the styles:

Books

Smith GM. 1938. Cryptogamic botany. Vol. II Bryophytes and Pteridophytes. 2nd. edn. New York, McGraw-Hill Book Company.

Chapters in books

Schupp EW, Feener DH. 1991. Phylogeny, lifeform, and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest. In: Huxley CR, Cutler DC. (eds.) Ant-plant interactions. Oxford, Oxford University Press. p. 175-197.

Research papers

Alves MF, Duarte MO, Oliveira PEAM, Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.

Papers in press (ahead of print)

Alves JJ, Sampaio MTY. 2015. Structure and evolution of flowers. *Acta Botanica Brasilica* (in press). doi: 10.1590/0102-33062015abb3339.

Online-only journals

Wolkovich EM, Cleland EE. 2014. Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants* 6: plu013 doi:10.1093/aobpla/plu013

Thesis (citation should be avoided)

Souza D. 2014. Plant growth regulators. PhD Thesis, University of Brazil, Brazil.

Websites and other sources (citation should be avoided)

Anonymous. 2011. Title of booklet, leaflet, report, etc. City, Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: author(s) name author(s) initial(s). year. Full title of article. Full URL. 21 Oct. 2014 (Date of last successful access).

Acknowledgements should be preferably in fewer than 80 words. Be concise: “we thank...” is preferable to “The present authors would like to express their thanks to...”. Funding information should be included in this section.

The following example should be followed:

We acknowledge the Center of Microscopy (UFMG) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. We also thank J.S. Santos

for assistance with the statistical analyses. This work was supported through a research grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (ID number).

For **SHORT COMMUNICATIONS** note that the editorial guidelines applying to original papers must also apply here. In general, the difference between original papers and short communications is the **lack of subsections in the text** and limited space for illustrations in the latter. Figures and tables can be present, assuming that the overall size of the manuscript does not exceed the five printed page limit (supplementary material can be added). The abstract (as described for original articles) must be followed by a “running text” (a single section, without subheadings), followed by the acknowledgments and references.

Preparing Figures, Tables and Supplementary material

All figures (photographs, maps, drawings, graphs, diagrams, etc.) and tables must be cited in the text, in ascending order. Citations of figures in the text should appear in an abbreviated, capitalized form (e.g., Fig. 1, Fig. 2A-D, Fig. 3A, Figs. 3A, 4C, Tab.1).

The maximum dimensions of individual figures should be 170 × 240 mm. The width of an individual component can be 170 mm or 85 mm, without exception, whereas the height can be ≤240 mm. For continuous tone images (e.g., photographs), please supply TIFF files at 300 dpi. More complex drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi TIFF files.

Grouping of related graphics or images into a **single figure** (a plate) is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled with sequential capital letters, in the order of their citation in the text (A, B, C, etc.). The letters that identify individual images should be inserted within white circles in the lower right-hand corner. For separate the grouped images, authors should insert white bars (1mm thickness).

Individual images (not grouped as a plate) should be identified with sequential Arabic numerals, in the order of their citation in the text (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.), presented in the same manner as the letters identifying individual images (described above).

The number that identifies a grouped figure (e.g., Fig. 2) should not be inserted into the

plate but should rather be referenced only in the figure caption and the text (e.g., Fig. 2A-C).

Scale bars, when required, should be positioned in the lower right-hand corner of the figure. The scale bar units should be given either at the end of the figure caption or, when a figure contains multiple scale bars with different units, above each bar.

Details within a figure can be indicated with arrows, letters or symbols, as appropriate.

Tables should be preceded by titles, indicated with sequential Arabic numerals (Table 1, 2, 3, etc.; do not abbreviate). Tables should be created using the Table function of Microsoft Word™. Columns and rows should be visible, although no dark lines should be used to separate them. Horizontal rules should be used only at the top (below the title) and bottom (below the final row) of the table. Do not use fills, shading or colors in the tables.

When appropriate, excess (but important) data can be submitted as Supplementary Files,

which will be published online and will be made available as links. This might include additional figures, tables, or other materials that are necessary to fully document the research contained in the paper or to facilitate the readers' ability to understand the work.

Supplementary Materials are generally not peer refereed. When a paper is published, the Supplementary Materials are linked from the main article webpage. They can be cited using the same DOI as the paper.

Supplementary Materials should be presented in appropriate .doc or .pdf file format. These archives should contain inside all supplementary tables and files and any additional text. The full title of the paper and author names should be included in the header. All supplementary figures and tables should be referred in the manuscript body as “Table S1” and/or “Figure S1”.

Acta bot. bras. intends to maintain archives of Supplementary Materials but does not guarantee their permanent availability. *Acta bot. bras.* reserves the right to remove Supplementary Materials from a published article in the future.

The Review Process

All authors will receive an email acknowledging the submission of the manuscript, with its correspondent reference number. The Editor-in-Chief will evaluate manuscript adherence to

instructions, quality and novelty and will decide on the suitability for peer reviewing. Manuscripts failing to adhere to the format will be returned to the authors. Manuscripts are sent to at least two anonymous referees that are given 21 days to return their reports.

Submitting a revised paper

After peer review, go to “click here to submit a revision” and upload the new manuscript version. Remember to delete the documents in duplicate.

Publication and printing process

After acceptance, a PDF proof will be sent to corresponding authors as an e-mail attachment. Corrected proofs should be returned within 72 h. It is the sole responsibility of the corresponding author to check for errors in the proof.

Each article is identified by a unique DOI (Digital Object Identifier), a code used in bibliographic referencing and searching.

The dates of submission and acceptance will be printed on each paper.

The corresponding author will receive a free PDF or URL that gives access to the article online and to a downloadable PDF.

The corresponding author is responsible for distributing this PDF or URL to any coauthors.

Misconduct

Misconduct on submitted manuscripts will lead to immediate rejection. Duplicate publication, plagiarism, figure manipulation, dual-submission, and any other fraudulent method will not be tolerated.

If misconduct is detected after the manuscript publication, the article will be retracted and a retraction note will be published.

Submitted manuscripts can be scanned to detect plagiarism and verify the papers original.